

Załącznik nr 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

AUTOREFERAT

dr n. wet. Magdalena Florek

Zakład Mikrobiologii
Katedra Patologii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław, 2023

1. Imię i nazwisko.
 - Magdalena Anna Florek; ORCID: 0000-0001-6921-1883

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe i artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.
 - 2006 - stopień naukowy: doktor nauk weterynaryjnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Charakterystyka grzybów drożdżopodobnych izolowanych od psów”. Promotor pracy doktorskiej: prof. dr hab. Zdzisław Staroniewicz.
 - 2000 - tytuł zawodowy: lekarz weterynarii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Akademia Rolnicza we Wrocławiu.

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.
 - Adiunkt (1.10.2009-do chwili obecnej), Katedra Patologii, Zakład Mikrobiologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu.
 - Pracownik techniczny (2006-2009) Katedra Patologii, Zakład Mikrobiologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu.
 - Studia doktoranckie (01.10.2001-06.03.2006), słuchaczka studiów doktoranckich w Katedrze Patologii, 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:

„Występowanie, struktura genetyczna oraz lekowrażliwość grzybów należących do kompleksów gatunków *Cryptococcus neoformans*/ *C. gattii* w Polsce, na podstawie analizy populacji środowiskowej oraz weterynaryjnej izolatów pochodzących od zwierząt wskaźnikowych”.

Cykl obejmuje 3 oryginalne prace opublikowane w czasopismach indeksowanych w bazie Journal Citation Reports (JCR), których sumaryczny IF wynosi 10,427, a łączna liczba punktów MNiSW to 280.

4.1. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego.

(1) **Florek Magdalena**, Korzeniowska-Kowal Agnieszka, Wzorek Anna, Włodarczyk Katarzyna, Marynowska Maja, Pogorzelska Aleksandra, Broda Maria, Ploch Sebastian, Buczek Daniel, Balon Katarzyna, Nawrot Urszula: Prevalence, genetic structure, and antifungal susceptibility of the *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex strains collected from the arboreal niche in Poland. *Pathogens*, 2022, 11, 1-15 (IF=3,7; pkt. MNiSW 100).

Udział własny: W niniejszej publikacji byłam twórcą hipotezy badawczej, pomysłodawcą układu badawczego, pobierałam materiał do badań, dokonałam izolacji i identyfikacji mikroorganizmów, wykonałam 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) **Florek Magdalena**, Nawrot Urszula, Korzeniowska-Kowal Agnieszka, Włodarczyk Katarzyna, Wzorek Anna, Woźniak-Biel Anna, Brzozowska Magdalena, Galli Józef, Bogucka Anna, Król Jarosław: An analysis of the population of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from animals in Poland, in the years 2015–2019. *Scientific Reports*, 2021, 11, 1-12 (IF=4,997; pkt. MNiSW 140).

Udział własny: W niniejszej publikacji byłam twórcą hipotezy badawczej, pomysłodawcą układu badawczego, pobierałam materiał do badań, dokonałam izolacji i identyfikacji mikroorganizmów, wykonałam 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) **Florek Magdalena**, Król Jarosław, Woźniak-Biel Anna: Atypical *URA5* gene restriction fragment length polymorphism banding profile in *Cryptococcus neoformans* strains. *Folia Microbiologica*, 2019, 64, 857-860. (IF=1,730; pkt. MNiSW 40).

Udział własny: W niniejszej publikacji byłam twórcą hipotezy badawczej, pomysłodawcą układu badawczego, przeprowadziłam badania molekularne, 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

Kryptokokoza jest ciężką oraz nierzadko śmiertelną chorobą ludzi i zwierząt, powodowaną przez grzyby należące do rodzaju *Cryptococcus*. W przypadku omawianej jednostki, śmiertelność zakażonych osób może sięgać od 6,5% do nawet 73% [1-9]. Brakuje natomiast danych literaturowych dotyczących zagrożenia, jakie kryptokokoza stanowi dla zwierząt.

Za wystąpienie infekcji, zarówno u ludzi jak i zwierząt, odpowiedzialne są głównie dwa gatunki należące do omawianego rodzaju, a mianowicie *Cryptococcus neoformans* i *C. gattii*, często określane wspólnie jako *C. neoformans/C. gattii* species complex (CNGSC). Oba są patogenami środowiskowymi, których pierwotną niszę stanowią rozkładające się szczątki roślinne, w tym głównie szczątki należących do różnych gatunków drzew, oraz gleba. Wtórnie, multiplikacja oraz rozprzestrzenianie omawianych grzybów mogą być związane z aktywnością zwierząt – przede wszystkim ptaków, wśród których dominują gołębie. Opisane zostały również przypadki rozprzestrzeniania *C. gattii* przez skolonizowane osobniki koala. Do zakażenia każdym z wymienionych gatunków dochodzi głównie drogą wziewną, co wiąże się z obecnością w środowisku propaguli (bazydiospor lub wyschniętych blastospor) tych drożdżaków. [10-12]

Zgodnie z klasyfikacją obowiązującą od początku obecnego wieku, w obrębie CNGSC wyróżniamy *C. neoformans* z odmianami *grubii* i *neoformans* oraz *C. gattii*. Rozwój technik molekularnych, między innymi takich jak polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów (ang. *amplified fragment length polymorphism* (AFLP)), polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang. *restriction fragments length polymorphism* (RFLP)), czy wreszcie metoda *multilocus sequence typing* (MLST), pozwolił na wyodrębnienie w omawianym kompleksie tzw. głównych typów molekularnych (*major molecular types* (MMT)). I tak, wariantowi *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, opisywanemu również serotypem A, przyporządkowano MMT VNI, VNII oraz VNB. *C. neoformans* var. *neoformans* (serotyp D) reprezentowany jest przez MMT VNIV. Hybrydę serotypów A i D oznacza się jako VNIII. Natomiast w obrębie *C. gattii* (serotyp B lub C) wyróżniono MMT VGI, VGII, VGIII, VGIV i VGV. W 2015 pojawiła się propozycja zmian w klasyfikacji, zgodnie z którą istniałyby dwa gatunki *C. neoformans* (*C. neoformans* (VNI, VNB, VNII) oraz *C. deneoformans* (VNIV)) oraz pięć gatunków *C. gattii* (*C. gattii* (VGI), *C. deuterogattii* (VGII), *C. bacillisporus* (VGIII), *C. tetragattii* (VGIV) oraz *C. decagattii* (VGIV/VGIIIc)). Jednakże propozycja ta nie znalazła uznania wśród części

naukowców. W związku z powyższym, w chwili obecnej funkcjonują jednocześnie oba systemy klasyfikacyjne. Jednakże w ramach konsensusu, zaczęto wyróżniać dwa kompleksy gatunków – *C. neoformans* species complex (CNSC) oraz *C. gattii* species complex (CGSC). Dla zachowania jasności opisywanego problemu, w dalszej części tekstu stosowana będzie nomenklatura dotycząca dwóch gatunków z odmianami, podział na MMT oraz CNSC/CGSC. [13-16]

Omawiane kompleksy gatunków charakteryzują się dwubiegunowym systemem koniugacyjnym (składającym się z pojedynczego *locus MAT* reprezentowanego przez typy koniugacyjne α i β) i mogą koniugować zarówno biseksualnie, jak i uniseksualnie [17-18].

Choć grzyby z opisywanych kompleksów nie należą do patogenów nowo poznanych, to w ostatnich latach, ze względu na pojawienie się nietypowych wzorców zachorowań, a także dzięki nieustającemu zainteresowaniu naukowców pojawiło się kilka nowych, wymagających odpowiedzi pytań dotyczących biologii, sposobu rozprzestrzeniania oraz patogenności CNSC/CGSC. Tradycyjnie przyjmowało się, że grzyby z CNSC są organizmami występującymi na całym świecie, natomiast CGSC wiązany był raczej z obszarami tropikalnymi i subtropikalnymi. W roku 2000 w Kanadzie, na wyspie Vancouver doszło do pojawienia się bardzo licznych przypadków kryptokokozy wśród ludzi i zwierząt, spowodowanej zakażeniami *C. gattii*. Podobna sytuacja miała miejsce w północno-zachodnich Stanach Zjednoczonych. Patogen ten izolowany był ze środowiska w Ameryce Północnej, a w kolejnych latach także w strefie umiarkowanego klimatu Europy. Przypadki zachorowań z udziałem tego czynnika notowane były u naszych zachodnich sąsiadów. W kilku przypadkach wykluczono, iż przyczyną infekcji niemieckich pacjentów była reaktywacja uśpionego procesu związanego z zawleczeniem patogenu z innych regionów świata. Niestety na terenie Niemiec nie prowadzono badań środowiskowych pozwalających stwierdzić endemiczne zasiedlenie środowiska CGSC. Badanie zasiedlenia terenów Europy o umiarkowanym klimacie zdaje się ważne, szczególnie z tego względu, że w przeciwieństwie do *C. neoformans*, *C. gattii* może powodować zachorowania u osób bez obniżonej odporności. [19-24]

Zbadano, że nie tylko gatunki należące do CNSC/CGSC, ale także poszczególne typy molekularne mogą różnić się patogennością, powodować odmienny obraz choroby, a także wykazywać inną oporność na preparaty przeciwgrzybicze lub być podstawą odmiennego rokowania klinicznego. Wiadomo również, że poszczególni przedstawiciele CNSC/CGSC wykazują predylekcję do nieco odmiennych warunków klimatycznych oraz gatunków drzew jako niszy pierwotnej, co wpływa na mapę zasiedlania poszczególnych regionów geograficznych. Dotychczasowe badania dotyczące środowiskowego występowania w Europie

grzybów z kompleksów CNSC/CGSC, skupiały się głównie na południowej części kontynentu. Pojawiły się także pojedyncze opracowania dotyczące Europy Zachodniej. Niewiele natomiast wiadomo na temat występowania omawianych grzybów na terenie Europy Środkowej i Wschodniej, związanej ze strefą klimatu kontynentalnego, w której znajduje się Polska. Szczegółowe badania dotyczące występowania środowiskowych źródeł kryptokoków (w tym określenie poszczególnych gatunków drzew), są niezbędne do zdefiniowania ich zasięgu geograficznego, struktury populacji, sposobu oraz ryzyka transmisji. Ma to znaczenie tym bardziej, iż dowiedziono związku między czynnikami środowiskowymi, także tymi związanymi z pierwotną arboralną niszą, a pojawieniem się w populacji omawianych grzybów czynników zjadliwości umożliwiających infekowanie organizmu gospodarza. W chwili obecnej zakłada się, że środowiskowe ryzyko ekspozycji na grzyby z CNSC/CGSC w Europie dotyczy 137 to 360 milionów osób, lecz, ze względu na brak badań dotyczących dużej części kontynentu, są to jedynie dane uzyskane drogą modelowania komputerowego. [25-36]

Zwierzęta indykatorowe (ang. *sentinel animals*), są to gatunki naturalnie zasiedlające dane środowisko lub umieszczane w nim w sposób celowy, które dzięki wysokiej wrażliwości lub ze względu na prezentowanie zachowań sprzyjających ekspozycji na dany patogen, mają za zadanie sygnalizować jego obecność na badanym terenie. Mając na uwadze charakter pierwotnej niszy grzybów należących do CNSC/CGSC, zachowania takie jak węszenie, kopanie w ziemi, kontakt z drzewami lub ich szczątkami oraz procesy takie jak naturalna filtracja prowadzące do zwiększanie koncentracji patogenu w jamie nosowej, czy też pasaż patogenów przez przewód pokarmowy, pewne gatunki można uznać za idealne zwierzęta indykatorowe dla obecności kryptokoków w środowisku. W dostępnych publikacjach znaleźć możemy opisy wykorzystania do tej roli zarówno dzikich, jak i udomowionych zwierząt. Co więcej, użycie zwierząt w charakterze testerów umożliwiło wykrycie CNSC/CGSC, na obszarze, gdzie badanie konwencjonalnych próbek środowiskowych nie wykazywało obecności tych grzybów. [37-46]

Bez właściwej terapii infekcje spowodowane przez drożdżaki z kompleksów CNSC/CGSC, a szczególnie spowodowane przez nie zapalenie mózgu, prowadzą do śmierci. W leczeniu tej postaci kryptokokozy stosowane są preparaty przeciwgrzybicze takie jak amfoterycyna B z 5-fluorocytozyną, itraconazol, flukonazol czy worykonazol. Niestety, pojawiają się wciąż nowe doniesienia wskazujące na narastającą wśród omawianych grzybów oporność na antymikotyki. Przyczyn tego zjawiska dopatrywać się należy w niezwykle ciekawej biologii i dużej plastyczności kryptokoków. Wśród przyczyn zmniejszenia wrażliwości na preparaty przeciwgrzybicze podaje się takie ciekawe mechanizmy jak

heterorezystencja związana z aneuploidalnością chromosomów, tworzenie postaci typu „titan cell” o zmodyfikowanej strukturze ściany i otoczki, oraz mutacje genów, szczególnie zaznaczone w przypadku szczepów wykazujących zwiększoną częstotliwość mutacji (*hypermutator phenotype*). Jedną z ostatnio badanych teorii wskazuje jako przyczynę narastania oporności często występujące u ludzi, prawdopodobnie też u zwierząt, subkliniczne lub latentne zakażenia powodowane przez CNSC/CGSC, co powoduje, że uśpione szczepy grzyba w przeciągu życia gospodarza mogą być narażone na stosowane terapeutycznie antymikotyki lub używane w rolnictwie fungicydy. Opisane powyżej mechanizmy wpływają na to, że lekooporność stwierdzana jest także wśród izolatów środowiskowych lub klinicznych, pozyskiwanych od pacjentów jeszcze przed procesem leczenia. [47-50]

Analiza restrykcyjna polimorfizmu długości fragmentów genu pirofosforylasy monofosforanu orotydy (URA5-RFLP) jest jedną z technik typowania stosowanych w molekularnych badaniach epidemiologicznych dotyczących kryptokoków. W metodzie tej typ molekularny (MMT) rozpoznawany jest wizualnie, poprzez porównanie elektroforegramów produktów amplifikacji genu *URA5* poddanych działaniu enzymów restrykcyjnych (HhaI i Sau96I), uzyskanych z badanych izolatów oraz szczepów wzorcowych reprezentujących poszczególne MMT. Dlatego też pojawienie się szczepów wykazujących nietypowe wzory restrykcji może utrudnić lub nawet uniemożliwić ich prawidłowe rozpoznanie przy użyciu omawianej metody [51].

Spektrometryczna metoda laserowej jonizacji/desorpcji próbki wspomaganą matrycą z analizatorem czasu przelotu (ang. *matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight analyzer mass spectrometry* (MALDI-TOF MS)) opiera się na analizie białek rybosomalnych, unikatowych dla danej rodziny, rodzaju i gatunku, a nawet szczepu drobnoustroju. Umożliwia ona dokładną identyfikację zarówno bakterii, jak i grzybów, przy stosunkowo niskich kosztach badania, dzięki czemu metoda ta stosowana jest co raz częściej zarówno w mikrobiologii klinicznej, jak i doświadczałnej. Chociaż istnieją doniesienia o przydatności tej techniki w rozpoznawaniu CNSC/CGSC na poziomie gatunku, a nawet podgatunku/typu molekularnego, zaobserwowano również, że obecność otoczki, jak również skład ściany komórkowej sprawiają, że identyfikacja tych patogenów za pomocą MALDI-TOF MS jest trudna w porównaniu do innych, klinicznie istotnych grzybów. Dodatkowo zauważono, że w niektórych wersjach baz oprogramowania dedykowanych do pracy ze spektrofotometrem typu MALDI-TOF MS, widma poszczególnych MMT kryptokoków należących do omawianego kompleksu są niedoreprezentowane, w związku z czym uzupełnianie istniejących lub stwarzanie własnych baz widm wpływa korzystnie na wzrost jakości identyfikacji. [52-58]

4.2.2. Uzasadnienie podjętych badań oraz cele badawcze.

Kryptokokoza, szczególnie ta spowodowana przez grzyby z kompleksu CNSC, jest schorzeniem w większości przypadków oportunistycznym. Kiedyś infekcja ta miała głównie związek ze współistniejącym zakażeniem HIV. Od jakiegoś czasu notowany jest spadek śmiertelności związanej z kryptokokozą u wymienionej grupy chorych, natomiast wciąż stanowi ona problem wśród pacjentów należących do innych grup ryzyka. Obecnie znaczenie omawianych patogenów może wzrosnąć. Badania epidemiologiczne dotyczące zakażeń SARS-CoV-2 wskazują, że niewydolność układu oddechowego i upośledzenie odporności obserwowane u pacjentów z COVID-19 zwiększają ryzyko wystąpienia oportunistycznych zakażeń grzybiczych, wśród których jednym z najbardziej prawdopodobnych jest kryptokokoza [59].

Pomimo potencjalnie dużego znaczenia grzybów należących do CNSC/CGSC, dane dotyczące występowania tego czynnika i struktury jego populacji w Polsce nie były dotychczas zbyt dobrze udokumentowane. W Polsce, ze względu na brak obowiązku raportowania przypadków infekcji, bardzo niewiele wiadomo na temat występowania kryptokokozy u ludzi i zwierząt. Podobnie mało wiadomo na temat środowiskowego występowania tych grzybów. W naszym kraju opublikowano jedynie kilka badań dotyczących szczepów środowiskowych. *C. neoformans* został wykryty w 35.3% badanych piaskownic i 19% próbek ziemi pobranych na terenie placów zabaw w Łodzi [60, 61]. Drożdżak ten został także wyizolowany z wód jeziora Charzykowskiego oraz Zalewu Szczecińskiego [62, 63]. W żadnej z wymienionych publikacji nie stosowano jednak metod genetycznych. Dla uzyskania odpowiedzi dotyczących powyższych zagadnień, niezbędne jest zastosowanie, i dostosowanie do potrzeb identyfikacji badanego rodzaju grzybów, metod diagnostycznych czułych, łatwych do wykonania i stosunkowo niedrogich, dających jednak możliwość identyfikacji kryptokoków do poziomu MMT. Kolejnym problemem wymagającym zbadania jest lokalna wrażliwość omawianych grzybów na standardowo stosowane preparaty przeciwgrzybicze.

Mając na uwadze przedstawione dane postawiono następujące cele badawcze:

- **Cel 1:** Ocena częstości występowania oraz struktura genetyczna populacji grzybów z kompleksów CNSC/CGSC w Polsce. Ustalenie składu gatunkowego drzewnej niszy pierwotnej występowania kryptokoków. Zwierzęta jako nisza wtórna, a także indyktor występowania badanych grzybów w środowisku.
- **Cel 2:** Zastosowanie techniki MALDI-TOF MS do identyfikacji gatunków oraz głównych typów molekularnych grzybów z kompleksów CNSC/CGSC.

- **Cel 3:** Ocena lekooporności naturalnie występujących szczepów grzybów z kompleksów CNSC/CGSC w Polsce.
- **Cel 4:** Identyfikacja oraz analiza atypowego profilu restrykcyjnego uzyskanego w teście *URA5-RLFP* dla izolatów należących do CNSC.

Omówienie wyników osiągnięcia naukowego:

- **Cel 1:** Ocena częstości występowania oraz struktura genetyczna populacji grzybów z kompleksów CNSC/CGSC w Polsce. Ustalenie składu gatunkowego drzewnej niszy pierwotnej występowania kryptokoków. Zwierzęta jako nisza wtórna, a także indikator występowania badanych grzybów w środowisku (publikacje **1** i **2**).

Materiał do badań stanowiły 1253 próbki pochodzące od zwierząt (n=651; publikacja **2**) lub pozyskane z drzew oraz gleby (n=602; publikacja **1**). Z badanego materiału wyizolowano łącznie 36 szczepów. Ponadto, z partnerskiego laboratorium Vetlab pozyskano 22 izolaty zwierzęce (publikacja **2**), pochodzące głównie od gołębi.

Na podstawie oceny zebranego materiału nie stwierdzono obecności w środowisku na badanym terenie grzybów należących do kompleksu CGSC. Natomiast średnią częstość występowania siostrzanego kompleksu CNSC oceniono na 2,075%, z nieco większą przewagą występowania próbek pozytywnych w materiale roślinnym (2,16%) w porównaniu z materiałem zwierzęcym (1,997%). Z badanego materiału pozyskiwano przeważnie pojedyncze izolaty, natomiast kilkakrotnie z próbki izolowane były szczepy mnogie.

Jeśli chodzi o niszę pierwotną, jaką dla badanych patogenów są drzewa, obecność kryptokoków stwierdzono zarówno u przedstawicieli drzew iglastych (sosna (*Pinus* L.), daglezcja zielona (*Pseudotsuga menziesii*)), jak i liściastych ((dąb (*Quercus* L.), brzoza (*Betula* L.)). Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic dotyczących częstości izolacji CNSC z poszczególnych gatunków badanych drzew. Należy podkreślić, iż wyniki izolacji CNSC z materiału roślinnego są pierwszymi w kontynentalnej części Europy, po nieudanych próbach izolacji, jakie miały miejsce w Niemczech, Rosji i kontynentalnej części Chorwacji [11, 64, 65]. Choć grzyby z omawianego kompleksu izolowane były wcześniej, na innych obszarach świata, z drzew należących do rodzajów *Quercus* i *Pinus* [11], to do tej pory daglezcja zielona łączona była raczej z występowaniem *C. gattii* [66, 67]. Natomiast w Europie brak jest doniesień o izolacji kryptokoków z brzozy.

Obecność w środowisku mikroorganizmów z kompleksów CNSC/CGSC powoduje, iż przebywające w nim zwierzęta mogą zostać, w pewnym stopniu, skolonizowane przez omawiane grzyby. Skolonizowane zwierzęta mogą przez pewien okres czasu podtrzymywać

populację kryptokoków i przyczyniać się do ich rozprzestrzeniania na nowych terenach, co czyni z nich wtórną niszę tych mikroorganizmów. Jednakże, w większości przypadków, kolonizacja ta nie ma znaczenia środowiskowego, a skolonizowane zwierzęta traktowane mogą być jako wskaźnik obecności patogenu w środowisku. Wśród 421 zwierząt, zarówno ssaków (n=130) i ptaków (n=291), u 10 (2,37%) udało się wykryć obecność badanych grzybów. Większość izolatów CNSC pobrana została od gołębi (9 z 10 pozytywnych izolacji). Stwierdzono znaczne różnice częstości izolacji między gołębiami domowymi (*Columba livia* f. *domestica*), a dzikimi (*Columba livia*). Podczas, gdy w pierwszej z wymienionych grup badane grzyby pozyskane zostały od 6,54% ptaków – w drugiej tylko od 1,54%. Ponadto, u ptaków domowych grzyby izolowane były z wymazów pobranych bezpośrednio z organizmu, natomiast u dzikich wyłącznie z próbek kału. Porównując miejsca pobrania wymazów, badane patogeny najczęściej izolowane były z wola (5,21%), jamy dziobowej (3,48%), a najrzadziej z kloaki (0,87%).

Badaniom genetycznym poddano szczepy wyizolowane z analizowanego powyżej materiału roślinnego i zwierzęcego, a także te (pochodzenia zwierzęcego), pozyskane z laboratorium Vetlab, co pozwoliło uzyskać populację liczącą 58 szczepów. Do identyfikacji poszczególnych izolatów użyte zostały techniki MALDI-TOF MS oraz *URA5-RFLP*, które pozwoliły na przyporządkowanie badanych grzybów do gatunku, podgatunku oraz MMT. Wszystkie izolaty należały do CNSC. Znacząca większość szczepów (68,96%; n=40) reprezentowała *C. neoformans* var. *neoformans*/VNIV. Typ molekularny MMT VNI reprezentujący *C. neoformans* var. *grubii* stanowił 24,14% (n=14) populacji. Natomiast pozostałe izolaty (6,9%; n=4) zostały zidentyfikowane, jako hybrydy obu powyższych odmian, należące do MMT VNIII. Nie stwierdzono obecności MMT VNII, ani VNB. Zaobserwowano natomiast dość znaczne różnice struktury populacji pochodzącej z niszy pierwotnej i od zwierząt. Podczas, gdy izolowana z materiału roślinnego grupa składała się w 57,9% z izolatów należących do MMT VNIV, a 42,1% tych należących do VNI - w populacji izolowanej od zwierząt obserwowano zdecydowanie wyższy odsetek VNIV (74,36%), w porównaniu do VNI (15,38%). Co więcej, z materiału zwierzęcego udało się uzyskać hybrydy VNIII/AD (10,26%), których nie stwierdzono wśród izolatów roślinnych.

Następnie zidentyfikowane szczepy poddano molekularnej analizie serotypu i typu koniugacyjnego. Wśród badanych izolatów haploidalnych 14 (25,92%) reprezentowało serotyp/typ koniugacyjny A α , 38 (70,37%) - D α . W jednym przypadku stwierdzono rzadko występujący u grzybów należących do CNSC typ koniugacyjny a szczepu należącego do serotypu D. Izolat ten pozyskany był od zwierząt. Podobnie, w jednym przypadku uzyskano

rozbieżność wyników dla użytych metod – izolat rozpoznany pierwotnie jako VNIV, w teście oceny serotypu/typu koniugacyjnego zaprezentował się jako aADa. Otrzymana rozbieżność mogła być wynikiem aneuploidalności chromosomu 8, na którym znajduje się gen *URA5*, będący podstawą dla stosowanej w identyfikacji metody (*URA5*-RFLP). Wszystkie izolowane szczepy hybryd VNIII/AD należały do α AD α .

- **Cel 2:** Zastosowanie techniki MALDI-TOF MS do identyfikacji gatunków oraz głównych typów molekularnych grzybów z kompleksów CNSC/CGSC (publikacje 1 i 2).

Zalety techniki MALDI-TOF MS takie jak wysoka czułość, stosunkowo niskie koszty badań i krótki czas analizy, a z drugiej strony doniesienia o trudnościach, jakie grzyby z kompleksów CNSC/CGSC mogą sprawić podczas identyfikacji za pomocą omawianej metody, skłoniły nasz zespół do próby analizy polskiej populacji kryptokoków omawianym typem spektrometrii masowej. W badaniach oceniana była jakość identyfikacji ustalana na podstawie wyniku definiowanego przez producenta (<1.7 wynik niewiarygodny, 1.7-2.0 – prawdopodobny rodzaj, 2.0-2.3 pewny rodzaj/prawdopodobny gatunek, >2.3 – wysoce prawdopodobny gatunek), a także możliwość rozpoznania MMT (przez porównanie z MMT izolatu z bazy, stanowiącego pierwsze/najlepsze dopasowanie do szczepu badanego).

W pierwszym etapie badań, analiza dokonywana była wyłącznie z zastosowaniem bazy widm producenta. Stosując przyjęte kryteria jakości identyfikacji 1,73% izolatów nie została rozpoznana. Kolejne 39,65% uzyskało wynik między 1.7 a 2.0. Pewne rozpoznanie na poziomie rodzaju i prawdopodobne gatunkowe dotyczyło 55,17% szczepów, natomiast wysoce prawdopodobne gatunkowe 3,45%. Baza producenta pozwoliła na rozpoznanie na poziomie MMT wszystkich, (z wyjątkiem jednego) izolatów haploidalnych, lecz nie umożliwiła rozpoznania hybryd VNIII/AD.

W kolejnym etapie badań, do bazy wprowadzone zostały widma wszystkich brakujących szczepów referencyjnych (zgodnych z konsensusem MLST przyjętym dla CNSC/CGSC, między innymi szczep CBS132 – wzorzec hybrydy AD), będących wzorcami poszczególnych MMT oraz widma pięciu polskich izolatów reprezentujących różne MMT. Zastosowanie uzupełnionej bazy w pewnym stopniu poprawiło jakość identyfikacji. Wzrósł odsetek izolatów rozpoznanych jako pewny rodzaj/prawdopodobny gatunek (62,07%) oraz grupy z wynikiem >2.3 (5,17%). Jeśli chodzi o identyfikację MMT, wprowadzenie do bazy dwóch widm hybryd AD/VNIII spowodowało wzrost identyfikacji w tej grupie z 0 do 100%. Zmiana w bazie

spowodowała jednak błędne przyporządkowanie dwóch izolatów VNIV, które zostały rozpoznane jako VNIII.

Analiza wyników uzyskanych w niniejszych eksperymentach pozwoliła stwierdzić, że o ile identyfikacja MMT VNI przy użyciu MALDI-TOF MS nie stanowi problemu (izolaty uzyskiwały wyższe wyniki, a ich dopasowanie do MMT było w 100% poprawne), to pozostałe MMT mogą dawać błędne wyniki analiz. Powyższe dane mogą sugerować konieczność dostosowania baz w zakresie widm dla MMT innych niż VNI, a bieżąca sytuacja wynika prawdopodobnie z faktu, iż VNI jest najczęściej izolowanym wśród szczepów klinicznych typem molekularnym.

- **Cel 3:** Ocena lekooporności naturalnie występujących szczepów grzybów z kompleksów *C. neoformans*/*C. gattii* w Polsce (publikacje 1 i 2).

Materiał do badań stanowiło 58 opisanych powyżej izolatów należących do CNSC. Każdy z nich został fenotypowo scharakteryzowany pod kątem wrażliwości na najczęściej stosowane preparaty przeciwgrzybicze (amfoterycyna B (AMB), 5-fluorocytozyna (5FC), flukonazol (FLU), worykonazol (VOR), izawukonazol (ISV), itrakonazol (ITR), posakonazol (POS)). Badania wykonano metodą mikrorozcieńczeń w podłożu płynnym, zgodnie z rekomendacją EUCAST (European Comitee of Antimicrobial Susceptibility Testing), w celu oznaczenia minimalnego stężenia hamującego - MIC (Minimal Inhibitory Concentration). Zakresy wartości MIC dla poszczególnych preparatów przeciwgrzybiczych kształtowały się następująco [mg/L]: AMB 0,125-1; 5FC 1->64; FLU 0,06-32; ITR 0,015-0,5; ISU 0,015-0,25; VOR 0,015-0,125; POS 0,015-0,5.

W przeciwieństwie do patogenów bakteryjnych, dla pewnych gatunków grzybów brak jest ustandaryzowanych kryteriów oceny lekowrażliwości. I tak, w przypadku *Cryptococcus neoformans* jedyne opublikowane przez EUCAST kryteria oceny oporności dotyczą klinicznej wartości granicznej dla AMB (1 mg/L) oraz epidemiologicznego punktu odcięcia (ECOFF) dla POS i VOR (w obu przypadkach 0,5 mg/L). Dla pozostałych preparatów przyjęto epidemiologiczne punkty odcięcia opisane w literaturze. W przypadku AMB wartości MIC osiągnane dla badanych izolatów nie przekroczyły wartości referencyjnych. Podobna sytuacja miała miejsce w przypadku FLU, VOR, ISV, ITR oraz POS. Natomiast przyjęty dla 5FC epidemiologiczny punkt odcięcia (32 mg/L), pozwolił na tle szczepów dzikich (91,38%; n=53) wyodrębnić izolaty z nabytą opornością (8,62%; n=5). Wśród szczepów z nabytą opornością 4 izolowane były od zwierząt, natomiast jeden był izolatem roślinnym. Wszystkie należały do MMT VNIV.

- **Cel 4:** Identyfikacja oraz analiza atypowego profilu restrykcyjnego uzyskanego w teście *URA5*-RFLP dla izolatów *C. neoformans* (publikacje 1, 2 i 3).

W metodzie *URA5*-RFLP produkt PCR genu *URA5* *C. neoformans* lub *C. gattii* trawiony jest przy użyciu enzymów Cfr13I (Sau96I) i HhaI, dzięki czemu uzyskiwany jest wzór restrykcyjny, pozwalający przyporządkować badany izolat do MMT. Identyfikacja odbywa się tu poprzez wzrokowe porównanie wzorów uzyskanych dla szczepów referencyjnych i izolatów badanych.

W trakcie analizy populacji polskich szczepów, pojawił się izolat nie dający przyporządkować się do żadnego ze znanych wzorów referencyjnych. Co więcej, badanie wszystkich polskich hybryd VNIII/AD za pomocą omawianej metody wykazało, iż w ich wzorze restrykcyjnym część prążków pochodziła najwyraźniej od rodzica prezentującego podobną anomalię. Analiza serotypu atypowego izolatu wskazała, iż należał on do typu D. Aby potwierdzić wynik serotypizacji wykonano badanie techniką MLST, zgodnie z ustaleniami konsensusu dla CNSC/CGSC. Izolat rozpoznany został jako MMT VNIV, typ sekwencyjny 514, a nietypowo trawiący się allel jako *URA5* typ alleliczny #32. Aby w pełni wyjaśnić zagadnienie dokonano analizy mapy restrykcyjnej typowych i atypowych alleli *URA5*. Mapa restrykcyjna sekwencji genu *URA5* referencyjnego szczepu VNIV CBS10079 (WM629), prezentuje wzór restrykcyjny składający się z fragmentów DNA o wielkości około 115, 156, 186 i 318 bp. Natomiast na mapie restrykcyjnej szczepu atypowego zaobserwować można było pięć prążków (56, 117, 128, 156 i 348 bp). Anomalia pojawiła się z powodu obecności dodatkowego miejsca restrykcyjnego dla enzymu HhaI (5'...GCG↓C...3') w pozycji 376, wynikającego z substytucji tyminy na cytozynę w pozycji 374 (odpowiadającej pozycji 332 w sekwencji CBS10079). W wyniku czego, strawiony produkt PCR nietypowego szczepu utracił prążek o wielkości 184 bp, który został zastąpiony dwoma mniejszymi fragmentami (56 i 128 bp).

Co ciekawe, w przebiegu dalszych badań odkryto kolejnych 5 izolatów prezentujących ten sam atypowy wzór. W badanej populacji polskich izolatów przedstawiony powyżej atypowy allel wykryty został u 6 szczepów haploidalnych należących do MMT VNIV oraz 4 hybryd VNIII/AD, co łącznie stanowiło 17,24% wszystkich izolatów (5,55% populacji roślinnej i 23,08% zwierzęcej). Przegląd literatury wskazał, że szczepy posiadające ten sam, co opisany tutaj, typ alleliczny, zostały również wyizolowane w Belgii, Niemczech, Włoszech i Turcji. Jakkolwiek nie zostały one poddane analizie *URA5*-RFLP, w związku z czym opisana anomalia nie została wykryta.

Podsumowując, przeprowadzone badania po raz pierwszy wykazały, że:

- Częstość występowania w Polsce grzybów należących do kompleksu CNSC wynosi 2,075%. Częstość ta jest nieco wyższa w przypadku niszy pierwotnej niż niszy wtórnej. Nie stwierdzono obecności grzybów należących do CGSC.
- W naszym kraju niszę pierwotną badanych grzybów reprezentują drzewa takie, jak dąb, sosna, brzoza, daglezwia zielona. Izolacja CNSC z brzozy nie została wcześniej stwierdzona.
- Wśród gołębi, określanych jako wtórna nisza patogenu, częstość występowania CNSC różni się w znacznym stopniu, w zależności, czy jest to odmiana domowa, czy dzika badanych ptaków i w Polsce wynosi ona odpowiednio 6,542% i 1,545%.
- Struktura genetyczna badanej populacji szczepów wykazuje wyższy odsetek MMT VNIV w stosunku do VNI, niż notowany do tej pory w Europie. Odsetek izolacji szczepów VNIII/AD w Polsce zawierał się w zakresie stwierdzanym w Europie, i podobnie jak na kontynencie - szczepy należące do tego typu molekularnego częściej izolowane były z materiału zwierzęcego niż roślinnego. Wśród izolatów nieklinikcznych nie izolowano MMT VNII ani VNB.
- Typ koniugacyjny α izolowany był w Polsce równie rzadko jak na pozostałym terenie Europy i występował głównie w powiązaniu z serotypem D. Wyizolowane w kraju hybrydy AD/VNIII posiadały typ koniugacyjny α .
- Polskie szczepy należące do MMT innych niż VNI mogą stanowić problem podczas identyfikacji metodą MALDI-TOF MS, przy zastosowaniu wyłącznie dedykowanej przez producenta bazy widm w oprogramowaniu spektrometru.
- W badaniu wrażliwości szczepów nieklinikcznych na 5FC, 8,62% zakwalifikowano do grupy izolatów z nabytą opornością. W przypadku pozostałych badanych preparatów przeciwgrzybiczych wszystkie szczepy klasyfikowane były jako wrażliwe lub dzikie.
- Wykryto i zanalizowano atypowy profil restrykcyjny typu allelicznego #32 genu *URA5* występującego u 17,24% izolatów polskich należących do MMT VNIV i VNIII.

Piśmiennictwo:

1. Desnos-Ollivier, M., Patel, S., Raoux-Barbot, D., Heitman, J., Dromer, F., French Cryptococcosis Study G. Cryptococcosis serotypes impact outcome and provide evidence of *Cryptococcus neoformans* speciation. *MBio.*, 2015, 6, e00311.
2. Sow, D., Tine, R.C., Sylla, K., Djiba, M., Ndour, C.T., Dieng, T., et al. Cryptococcal meningitis in Senegal: epidemiology, laboratory findings, therapeutic and outcome of cases diagnosed from 2004 to 2011. *Mycopathologia*, 2013, 176, 443-449.

3. Kambugu, A., Meya, D.B., Rhein, J., O'Brien, M., Janoff, E.N., Ronald, A.R., et al. Outcomes of cryptococcal meningitis in Uganda before and after the availability of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis.*, 2008, 46, 1694-1701.
4. Hakim, J.G., Gangaidzo, I.T., Heyderman, R.S., Mielke, J., Mushangi, E., Taziwa, A., et al. Impact of HIV infection on meningitis in Harare, Zimbabwe: a prospective study of 406 predominantly adult patients. *AIDS*, 2000, 14, 1401-1407.
5. Jarvis, J.N., Bicanic, T., Loyse, A., Namarika, D., Jackson, A., Nussbaum, J.C., et al. Determinants of mortality in a combined cohort of 501 patients with HIV-associated Cryptococcal meningitis: implications for improving outcomes. *Clin Infect Dis.*, 2014, 58, 736-745.
6. Dromer, F., Mathoulin-Pelissier, S., Launay, O., Lortholary, O., French Cryptococcosis Study G. Determinants of disease presentation and outcome during cryptococcosis: The CryptoA/D study. *PLoS Med.*, 2007, 4, e21.
7. Brizendine, K.D., Baddley, J.W., Pappas, P.G. Predictors of mortality and differences in clinical features among patients with Cryptococcosis according to immune status. *PLoS One*, 2013, 8, e60431.
8. Bratton, E.W., El Hussein, N., Chastain, C.A., Lee, M.S., Poole, C., Sturmer, T., et al. Comparison and temporal trends of three groups with cryptococcosis: HIV-infected, solid organ transplant, and HIV-negative/nontransplant. *PLoS One*, 2012, 7, e43582.
9. Moreira, A.; Ferreira, M.S.; Ribas, R.M.; Borges, A.S. Cryptococcosis: Clinical epidemiological laboratorial study and fungi varieties in 96 patients. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 2006, 39, 255-258.
10. Kwon-Chung, K.J.; Fraser, J.A.; Doering, T.L.; Wang, Z.A.; Janbon, G.; Idnurm, A.; Bahn, Y.S. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. *Cold Spring Harb. Perspec. Med.*, 2014, 4, a019760.
11. Cogliati, M., D'Amicis, R., Zani, A., Montagna, M.T., Caggiano, G., De Giglio, O., Balbino, S., De Donno, A., Serio, F., Susever, S., et al. Environmental distribution of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* around the Mediterranean Basin. *FEMS Yeast Res.*, 2016, 16, 045.
12. Schmertmann, L.J., Danesi, P., Monroy-Nieto, J., Bowers, J., Engelthaler, D.M., Malik, R., Meyer, W., Krockenberger, M.B. Jet-Setting koalas spread *Cryptococcus gattii* VGII in Australia. *mSphere*, 2019, 4, e00216-19.
13. Kwon-Chung, K.J.; Bennett, J.E.; Wickes, B.L.; Meyer, W.; Cuomo, C.A.; Wollenburg, K.R.; Bicanic, T.A.; Castañeda, E.; Chang, Y.C.; Chen, J.; et al. The case for adopting the "species complex" nomenclature for the etiologic agents of cryptococcosis. *mSphere*, 2017, 2, e00357-16.
14. Meyer, W.; Aanensen, D.M.; Boekhout, T.; Cogliati, M.; Diaz, M.R.; Esposto, M.C.; Fisher, M.; Gilgado, F.; Hagen, F.; Kaocharoen, S.; et al. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med. Mycol.*, 2009, 47, 561-570.
15. Farrer, R.A.; Chang, M.; Davis, M.J.; van Dorp, L.; Yang, D.H.; Shea, T.; Sewell, T.R.; Meyer, W.; Balloux, F.; Edwards, H.M.; et al. A new lineage of *Cryptococcus gattii* (VGV) discovered in the central Zambesian Miombo woodlands. *mBio*, 2019, 10, e02306-e02319.
16. Hagen, F.; Khayhan, K.; Theelen, B.; Kolecka, A.; Polacheck, I.; Sionov, E.; Falk, R.; Parmen, S.; Lumbsch, H.T.; Boekhout, T. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet. Biol.*, 2015, 78, 16-48.
17. Kwon-Chung, K.J. Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia*, 1976, 68, 821-833.
18. Lin, X.; Hull, C.M.; Heitman, J. Sexual reproduction between partners of the same mating type in *Cryptococcus neoformans*. *Nature*, 2005, 434, 1017-1021.
19. Viviani MA, Cogliati M, Esposto MC, Lemmer K, Tintelnot K, Valiente MFC, et al. Molecular analysis of 311 *Cryptococcus neoformans* isolates from a 30 month ECMM survey of cryptococcosis in Europe. *FEMS Yeast Res.*, 2006, 6, 614-619.
20. Firacative, C.; Roe, C.C.; Malik, R.; Ferreira-Paim, K.; Escandón, P.; Sykes, J.E.; Castañón-Olivares, L.R.; Contreras-Peres, C.; Samayoa, B.; Sorrell, T.C.; et al. MLST and whole-genome-based population analysis of *Cryptococcus gattii* VGIII links clinical, veterinary and environmental strains, and reveals divergent serotype specific sub-populations and distant ancestors. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2016, 10, e0004861.
21. Kidd, S.E.; Hagen, F.; Tschärke, R.L.; Huynh, M.; Bartlett, K.H.; Fyfe, M.; Macdougall, L.; Boekhout, T.; Kwon-Chung, K.J.; Meyer, W. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc. National. Acad. Sci. USA*, 2004, 101, 17258-17263.
22. Chowdhary, A.; Randhawa, H.S.; Boekhout, T.; Hagen, F.; Klaassen, C.H.; Meis, J.F. Temperate climate niche for *Cryptococcus gattii* in Northern Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, 2012, 18, 172-174.
23. Smith, I.M., Stephan, C., Hogardt, M., Klawe, C., Tintelnot, K., Rickerts, V. Cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii* in Germany from 2004-2013. *Int J Med Microbiol.*, 2015, 305, 719-23.

24. Hagen, F., Colom, M.F., Swinne, D., Tintelnot, K., Iatta, R., Montagna, M.T., Torres-Rodriguez, J.M., Cogliati, M., Velegraki, A., Burggraaf, A., Kamermans, A., Sweere, J.M., Meis, J.F., Klaassen, C.H., Boekhout, T. Autochthonous and dormant *Cryptococcus gattii* infections in Europe. *Emerg Infect Dis.*, 2012, 18, 1618-24.
25. Thompson, G. R. 3rd. et al. Phenotypic differences of *Cryptococcus* molecular types and their implications for virulence in a *Drosophila* model of infection. *Infect. Immun.* 2014, 82, 3058–3065.
26. Torres-Rodríguez, J. M., Morera, Y., Baró, T., Corominas, J. M. & Castañeda, E. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in an immunocompetent mouse model. *Med. Mycol.*, 2003, 41, 59-63.
27. Cogliati, M. et al. Fundamental niche prediction of the pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Europe. *Environ. Microbiol.*, 2017, 19, 4318–4325.
28. Chowdhary, A., Randhawa, H.S., Prakash, A., Meis, J.F. Environmental prevalence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in India: An update. *Crit. Rev. Microbiol.*, 2012, 38, 1–16.
29. Castro de Silva, D.M.; Santos, D.C.S., Martins, M.A., Oliveira, L., Szeszs, M.W., Melhem, M.S.C. First isolation of *Cryptococcus neoformans* genotype VNI MAT-alpha from wood inside hollow trunks of *Hymenaea courbaril*. *Med. Mycol.*, 2016, 54, 97–102.
30. Ellis, D.H., Pfeiffer, T.J. Ecology, life cycle, and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. *Lancet*, 1990, 336, 923–925.
31. Maliehe, M., Ntoi, M.A., Lahiri, S., Folorunso, O.S., Ogundeji, A.O., Pohl, C.H., Sebolai, O.M. Environmental factors that contribute to the maintenance of *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Microorganisms*, 2020, 8, 180.
32. Pini, G., Faggi, E., Campisi, E. Enzymatic characterization of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* strains isolated in Italy. *Rev. Iberoam. De Micol.*, 2017, 34, 77–82.
33. Rizzo, J., Albuquerque, P.C., Wolf, J.M., Nascimento, R., Pereira, M.D., Nosanchuk, J.D., Rodrigues, M.L. Analysis of multiple components involved in the interaction between *Cryptococcus neoformans* and *Acanthamoeba castellanii*. *Fungal Biol.*, 2017, 121, 602–614.
34. Fu, M.S., Liporagi-Lopes, L.C., dos Santos, S.R., Tenor, J.L., Perfect, J.R., Cuomo, C.A., Casadevall, A. Amoeba Predation of *Cryptococcus neoformans* Results in Pleiotropic Changes to Traits Associated with Virulence. *mBio*, 2021, 12, e00567-21.
35. Bosch, C., Toplis, B., Vreulink, J.M., Volschenk, H., Botha, A. Nitrogen concentration affects amphotericin B and fluconazole tolerance of pathogenic cryptococci. *FEMS Yeast Res.*, 2020, 20, foaa010.
36. Alaniz, A.J.; Carvajal, J.G.; Carvajal, M.A.; Cogliati, M.; Vergara, P.M. Spatial quantification of the population exposed to *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* species complexes in Europe: Estimating the immunocompetent and HIV/AIDS patients under risk. *Risk Anal.*, 2020, 40, 524–533.
37. National Research Council (US) Committee on Animals as Monitors of Environmental Hazards. *Animals as Sentinels of Environmental Health Hazards*. National Academies Press (US); 1991.
38. Malik, R., Wigney, D. I., Muir, D. B., Gregory, D. J., Love, D. N. Cryptococcosis in cats: Clinical and mycological assessment of 29 cases and evaluation of treatment using orally administered fluconazole. *J. Med. Vet. Mycol.*, 1992, 30, 133–144.
39. Malik, R. et al. Cryptococcosis in dogs: A retrospective study of 20 consecutive cases. *J. Med. Vet. Mycol.*, 1995, 33, 291–297.
40. Duncan, C. et al. Subclinical infection and asymptomatic carriage of *Cryptococcus gattii* in dogs and cats during an outbreak of cryptococcosis. *Med. Mycol.*, 2005, 43, 511–516.
41. Malik, R. et al. Asymptomatic carriage of *Cryptococcus neoformans* in the nasal cavity of dogs and cats. *J Med. Vet. Mycol.*, 1997, 35, 27–3.
42. Krockenberger, M. B., Canfield, P. J., Malik, R. *Cryptococcus neoformans* in the koala (*Phascolarctos cinereus*): Colonization by *C. n.* var. *gattii* and investigation of environmental sources. *Med. Mycol.*, 2002, 40, 263–272.
43. Morera, N. et al. Ferrets as sentinels of the presence of pathogenic *Cryptococcus* species in the Mediterranean environment. *Mycopathologia*, 2014, 178, 145–151.
44. Bryan, H. M. et al. Exposure to infectious agents in dogs in remote coastal British Columbia: Possible sentinels of diseases in wildlife and humans. 2011, *Can. J. Vet. Res.*, 75, 11–17.
45. Danesi, P. et al. Multilocus sequence typing (MLST) and M13 PCR fingerprinting revealed heterogeneity amongst *Cryptococcus* species obtained from Italian veterinary isolates. *FEMS Yeast Res.*, 2014, 14, 897–909.
46. Singh, K., Rani, J., Neelabh Rai, G. K., Singh, M. The Southeastern Asian house mouse (*Mus musculus castaneus* Linn.) as a new passenger host for *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* molecular type VNI. *Med. Mycol.*, 2017, 55, 820–827.

47. Margriet, W.J. Hokkena, B.J. Zwaanc, W.J.G. Melchersa, P.E. Verweij. Facilitators of adaptation and antifungal resistance mechanisms in clinically relevant fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 2019, 132, 103254.
48. Billmyre, R.B., Applen, D., Clancey, S., Li, L.X., Doering, T.L., Heitman, J. 5-fluorocytosine resistance is associated with hypermutation and alterations in capsule biosynthesis in *Cryptococcus*. *Nat 55. Commun.*, 2020, 11, 127.
49. Zafar, H., Altamirano, S., Ballou, E.R., Nielsen, K. A titanic drug resistance threat in *Cryptococcus neoformans*. *Curr Opin Microbiol.*, 2019, 52, 158-164.
50. Bastos, R.W., Rossato, L., Goldman, G.H., Santos, D.A. Fungicide effects on human fungal pathogens: Cross-resistance to medical drugs and beyond. *PLoS Pathog.*, 2021, 17:e1010073.
51. Meyer, W. et al. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg. Infect. Dis.*, 2003, 9, 189–95.
52. Cieřlik, J., Wróblewska, M. MALDI TOF MS – nowe możliwości w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej. *Diagn Lab.*, 2018, 54, 99-104.
53. Lohmann, C. et al. Comparison between the Biflex III-Biotyper and the Axima-SARAMIS systems for yeast identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J. Clin. Microbiol.*, 2013, 51, 1231–1236.
54. Danilo, Y. et al. Does the capsule interfere with performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for identification of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*? *J. Clin. Microbiol.*, 2016, 54, 474–477.
55. Posteraro, B. et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry-based method for discrimination between molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *J. Clin. Microbiol.*, 2012, 50, 2472–2476.
56. Firacative, C., Trilles, L., Meyer, W. MALDI-TOF MS enables the rapid identification of the major molecular types within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex. *PLoS ONE*, 2012, 7, e37566.
57. Pence, M. A., McElvania TeKippe, E., Wallace, M. A., Burnham, C. A. Comparison and optimization of two MALDI-TOF MS platforms for the identification of medically relevant yeast species. *Eur. J Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2014, 33, 1703–1712.
58. Cassagne, C. et al. Evaluation of four pretreatment procedures for MALDI-TOF MS yeast identification in the routine clinical laboratory. *Med. Mycol.*, 2013, 51, 371–377.
59. Song, G.; Liang, G.; Liu, W. Fungal co-infections associated with global COVID-19 pandemic: A clinical and diagnostic perspective from China. *Mycopathologia*, 2020, 185, 599–606.
60. Wójcik, A.; Błaszowska, J.; Kurnatowski, P.; Góralska, K. Sandpits as a reservoir of potentially pathogenic fungi for children. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 2016, 23, 542–548.
61. Wójcik, A.; Kurnatowski, P.; Błaszowska, J. Potentially pathogenic yeasts from soil of children’s recreational areas in the city of Łódź (Poland). *Int. J. Occup. Med. Environ. Health*, 2013, 26, 477–487.
62. Kurnatowski, P.; Róźga, A.; Róźga, B.; Babski, P.; Wójcik, A. Potentially pathogenic fungi in the waters of the Charzykowskie Lake in Zaborski Landscape Park. *Wiad. Parazytol.*, 2007, 53, 109–115.
63. Dąbrowski, W.; Bogusławska-Wąs, E.; Daczowska-Kozon, E. Analysis od the Szczecin Lagoon waters fungi. *Acta Mycol.*, 1988, 33, 101–108.
64. Pllana-Hajdari, D.; Cogliati, M.; Cicmak, L.; Pleřko, S.; Mlinaric-Missoni, E.; Marekovic, I. First isolation, antifungal susceptibility, and molecular characterization of *Cryptococcus neoformans* from the environment in Croatia. *J. Fungi.*, 2019, 5, 99.
65. Vasilyeva, N.V.; Bosak, I.A.; Bogomolova, T.S.; Vybornova, I.V. Environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Saint Petersburg, Russia. *Mycoses*, 2009, 52, 54–55.
66. Chowdhary, A., Randhawa, H.S., Boekhout, T., Hagen, F., Klaassen, C.H., Meis, J.F. Temperate climate niche for *Cryptococcus gattii* in Northern Europe. *Emerg Infect Dis.*, 2012, 18, 172-4.
67. Hagen, F. Boekhout, T. The search for the natural habitat of *Cryptococcus gattii*. *Mycopathologia*, 2010, 170, 209-211.

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.

- 01.09.2010-30.01.2011 – Katedra Biologii i Chorób Dzikich Zwierząt, Wydział Higieny Weterynaryjnej i Ekologii, VFU BRNO; opiekun naukowy: prof. Ivan Literak, dr Monika Dolejska.

Celem wyjazdu była nauka technik i metod badania lekooporności bakterii z gatunku *E. coli*, głównie w odniesieniu do oporności tych mikroorganizmów na β -laktamazy. W trakcie stażu zapoznałam się z metodami izolacji i identyfikacji bakterii będących potencjalnymi nosicielami genów odpowiedzialnych za produkcję β -laktamaz o rozszerzonym spektrum (extended-spectrum beta-lactamases, ESBL), takich jak *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA}. Poznałam techniki detekcji oraz analizy genów, kaset genowych, integronów i plazmidów. Badałam także koniugacyjny transfer genetycznych czynników oporności u bakterii. Ponadto, w ramach stażu, zostałam włączona do projektu naukowego, którego celem była ocena fenotypowej i genetycznej charakterystyki bakterii z rodzajów *Escherichia* i *Klebsiella* w wodach pochodzących z końcowego etapu oczyszczania ścieków miejskich i szpitalnych (COV Brno-Modrice), a także badanie horyzontalnego przekazywania oporności przez te mikroorganizmy.

Efektom współpracy jest publikacja naukowa (IF równym 5,068; liczba cytowani wg. WoS 91):

- Dolejska Monika, Frolkova Petra, **Florek Magdalena**, Jamborova Ivana, Purgertova Michaela, Kutilova Iva, Cizek Alois, Guenther Sebastian, Literak Ivan. CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella* spp. isolates in municipal wastewater treatment plant effluents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2011, 66, 2784-2790.
(opis artykułu zawarłam w punkcie 7.1.1. niniejszego załącznika)

5.2. Współpraca z innymi instytucjami i ośrodkami naukowymi

- W ramach przynależności do grupy roboczej „Genotyping of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*” istniejącej przy ISHAM (International Society for Human and Animal Mycology), nawiązałam współpracę z dr Caroliną Firacative (School of Medicine and Health Sciences, Universidad del Rosario Bogota, Colombia) oraz dr Lucianą Trilles (Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil), w zakresie genotypowania izolatów klinicznych i środowiskowych *C. neoformans*/*C. gattii* metodą MLST według konsensusu ustalonego dla tych gatunków przez ISHAM. Uzyskane w ten sposób dane trafiają do stworzonej pod patronatem ISHAM bazy Fungal MLST

(<https://mlst.mycologylab.org/>). Zgromadzone dane dostępne są publicznie. Efektem moich działań jest odkrycie 17 nowych typów sekwencyjnych oraz 11 typów allelicznych grzybów należących do CNSC.

- Współpracuję z założycielem projektu SCrEEN Project, dr Massimo Cogliati (Department of Biomedical Sciences for Health, Università degli Studi di Milano, Milano, Italy). Wzięłam udział w badaniu *Cryptococcus* Hybrids Sequencing (CryHs), w ramach którego przeprowadziłam genotypowanie środowiskowych i klinicznych izolatów hybryd należących do CNSC izolowanych w Polsce.

Efektom współpracy jest doniesienie konferencyjne:

- Cogliati Massimo, Chen Min, Xu Jianping, Hitchcock Megan, Kwon Chung June, Yang Dong-Hoon, Rickerts Volker, Desnos Ollivier Marie, Silva Joao Inacio, Meyer **Wieland**, **Florek Magdalena**, Nawrot Urszula, Escandon Patricia, Puime Andrés, Roger Frederic, Bertout Sébastien: S8.5c MLST genotyping and phylogenetics of AD-hybrids. *Medical Mycology*, 2022, 60, nr Supplement 1, 29-29: S8.5c.

Manuskrypt będący efektem opisanej współpracy jest w trakcie recenzji.

- Prowadzę współpracę z pracownikami Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego (dr hab. Piotrem Smoleńskim, dr hab. Radosławem Starostą, dr Sabiną Jaros), dotyczącą oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej nowo syntezowanych związków chemicznych. Efektem podjętej współpracy jest 11 publikacji i 2 doniesienia konferencyjne:

1. Starosta Radosław, **Florek Magdalena**, Król Jarosław, Puchalska Małgorzata, Kochel Andrzej. Copper(I) iodide complexes containing new aliphatic aminophosphine ligands and diimines - Luminescent properties and antibacterial activity. *New Journal of Chemistry*, 2010, 34, 1441-1449.
2. Kirillov Alexander M., Wiczorek Sabina W., Lis Agnieszka, Guedes da Silva M. Fatima C., **Florek Magdalena**, Król Jarosław, Staroniewicz Zdzisław, Smoleński Piotr, Pombeiro Armando J. P. 1,3,5-Triaza-7-phosphaadamantane-7-oxide (PTA-O): New diamondoid building block for design of three-dimensional metal-organic frameworks. *Crystal Growth & Design*, 2011, 11, 2711-2716.
3. Starosta Radosław, Stokowa Kamila, **Florek Magdalena**, Król Jarosław, Chwiłkowska Agnieszka, Kulbacka Julita, Saczko Jolanta, Skała Jacek, Jeżowska-Bojczuk Małgorzata. Biological activity and structure dependent properties of cuprous iodide complexes with phenanthrolines and water soluble tris (aminomethyl) phosphanes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2011, 105, 1102-1108.
4. Starosta Radosław, Brzuszkiewicz Anna, Bykowska Aleksandra, Komarnicka Urszula, Bażanów Barbara, **Florek Magdalena**, Gadzała Łukasz, Jackulak Natalia Król Jarosław, Marycz Krzysztof. A novel copper(I) complex, [CuI(2,2'-biquinoline)P(CH₂N(CH₂CH₂)₂O)₃] - Synthesis, characterisation and comparative studies on biological activity. *Polyhedron*, 2013, 50, 481-489.

5. Jaros Sabina W., Smoleński Piotr, Guedes da Silva Fatima C., **Florek Magdalena**, Król Jarosław, Staroniewicz Zdzisław, Pombeiro Armando J. P., Kirillov Alexander M. New silver BioMOFs driven by 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane-7-sulfide (PTA-S): synthesis, topological analysis and antimicrobial activity. *Cryst. Eng. Comm.*, 2013, 15, 8060-8064.
6. Starosta Jarosław, Bykowska Aleksandra, Kyzioł Agnieszka, Płotek Michał, **Florek Magdalena**, Król Jarosław, Jeżowska-Bojczuk Małgorzata. Copper(I) (pseudo)halide complexes with neocuproine and aminomethylphosphines derived from morpholine and thiomorpholine – in vitro cytotoxic and antimicrobial activity and the interactions with DNA and serum albumins. *Chemical Biology & Drug Design*, 2013, 82, 579-586.
7. Bykowska Aleksandra, Starosta Radosław, Brzuszkiewicz Anna, Bażanów Barbara, **Florek Magdalena**, Jackulak Natalia, Król Jarosław, Grzesiak Jakub, Kaliński Krzysztof, Jeżowska-Bojczuk Małgorzata. Synthesis, properties and biological activity of a novel phosphines ligand derived from ciprofloxacin. *Polyhedron*, 2013, 60, 23-29.
8. Jaros Sabina W., Guedes da Silva Fatima C., **Florek Magdalena**, Oliveira M. Conceicao, Piotr Smoleński, Pombeiro Armando J. P., Kirillov Alexander. Aliphatic dicarboxylate directed assembly of silver(I) 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane coordination networks: Topological versatility and antimicrobial activity. *Crystal Growth & Design*. 2014, 14, 5408-5417.
9. Jaros Sabina W., Guedes da Silva Fatima C., **Florek Magdalena**, Piotr Smoleński, Pombeiro Armando J. P., Kirillov Alexander. Silver(I) 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane coordination polymers driven by substituted glutarate and malonate building blocks: Self-assembly synthesis, structural features, and antimicrobial properties. *Inorganic Chemistry*, 2016, 55, 5886-5894.
10. Jaros Sabina W., Haukka Matti, **Florek Magdalena**, Guedes da Silva Fatima C., Kirillov Alexander, Piotr Smoleński. New microbe killers: Self-assembled silver(I) coordination polymers driven by a cagelike aminophosphine. *Materials*, 2019, 12, 1-10: 3353.
11. Jaros Sabina W., Krogul-Sobczak Agnieszka, Bażanów Barbara, **Florek Magdalena**, Poradowski Dominik, Nesterov S. Dymtro, Śliwińska-Hill Urszula, Kirillov Alexander, Piotr Smoleński. Self-assembly and multifaceted bioactivity of a silver(I) quinolate coordination polymer. *Inorganic Chemistry*, 2021, 15435–15444.
12. Starosta Radosław, **Florek Magdalena**, Król Jarosław, Puchalska Małgorzata, Kochel Andrzej. Copper(I) iodide complexes with aromatic diimines and aliphaticaminophosphines: characterization, structures, antibacterial properties and study of interaction with pUC18 plasmid and bovine serum albumin. W: EUROBIIC 9: 9th European Biological Inorganic Chemistry Conference: book of abstracts. Cebrat M., Kulon K. (red.), 2008, Wrocław, Uniwersytet Wrocławski, 306-306.
13. Jaros Sabina W., **Florek Magdalena**, Bażanów Barbara, Nesterov Dmytro S., Kirillov Alexander, Smoleński Piotr. Bioactive aminophosphine coordination networks: synthesis, characterization and enhanced antimicrobial activity. W: AMBRA 2022: 1st International Conference on Advanced Materials for Bio-Related Applications. Wrocław, May 16-19, 2022. Book of abstracts, 2022, Institute of Low Temperature and Structure Research of the Polish Academy of Sciences, 44-44: O-09.

Część badań prowadzonych było w zakresie grantu NCN No 2012/07/B/ST5/00885 „Projektowanie polimerów koordynacyjnych nowej generacji z węzłami metalicznymi Cu, Ag i Au oraz wielofunkcyjnymi łącznikami organicznymi” (2013-2016), gdzie pełniłam rolę wykonawcy.

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

6.1. Działalność dydaktyczna

6.1.1. Zajęcia dydaktyczne

- Na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu prowadzę zajęcia obligatoryjne (ćwiczenia), w języku polskim i angielskim z przedmiotów „Mikrobiologia weterynaryjna/Veterinary microbiology” dla studentów II roku oraz „Ochrona zdrowia publicznego w stanach zagrożeń/Public health protection in a state of disaster” dla studentów III roku.
- 2002-2004 - prowadziłam zajęcia w języku polskim dla studentów III roku Wydziału Przyrodniczo-Technologicznego, kierunku Ochrona środowiska z przedmiotu „Mikrobiologia środowiska”.
- 2002-2005 – prowadziłam zajęcia dla studentów I roku Wydziału Biologii i Hodowli zwierząt, kierunku Rybactwo z przedmiotu „Mikrobiologia”.
- Prowadziłam zajęcia dla studentów II roku Wydziału Biologii i Hodowli zwierząt na kierunku Bezpieczeństwo Żywności z przedmiotu „Mikrobiologia ogólna”.

6.1.2. Opieka naukowa nad badaniami prowadzonymi przez studentów

- Pełnię rolę opiekuna organizacyjnego Studenckiego Koła Naukowego „Anthrax”, zrzeszającego studentów kierunku Weterynaria, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.
- Jestem opiekunem naukowym prowadzonej przez studentów pracy badawczej „Charakterystyka oporności gramujemnych pałeczek jelitowych w wodach oczyszczalni ścieków we Wrocławiu”.

6.1.3. Inne

- Pełniłam rolę opiekuna roku studiów stacjonarnych English Division w latach 2014-2020.
- Byłam członkiem jury XIV Międzynarodowej Konferencji Studenckich Kół Naukowych i 29 Sejmiku SKN (2012).

- Jestem współtwórcą programu przedmiotu „Ochrona zdrowia publicznego w stanach zagrożenia/Public health protection in a state of disaster”.
- Jestem współtwórcą programu fakultetu „Racjonalna terapia przeciwdrobnoustrojowa u zwierząt – praktyczne aspekty”.

6.2. Działalność popularyzatorska:

- Jestem współautorem rozdziału książki: Mikologia - co nowego? prof. dr hab. Eugeniusza Barana (red.). Wrocław, 2008, Cornetis, s.138-157.
- Jestem współautorem rozdziału monografii : Całkosiński Ireneusz, Rosińczuk-Tonderys Joanna, Janeczek Maciej, Florek Magdalena, Dobrzyński Maciej, Chrószcz Aleksander. Terroryzm w czasach antycznych, W: Katastrofy naturalne i cywilizacyjne: różne oblicza bezpieczeństwa. Żuber Marian (red.), 2010, Wrocław, Wyższa Szkoła Oficerska Wojsk Lądowych im. gen. T. Kościuszki, s.137-152.
- Wygłosiłam referat pt. „*Cryptococcus*, co nowego?” podczas IX Ogólnopolskiego Sympozjum z Cyklu „Biofilm tworzony przez drobnoustroje w patogenezie zakażeń” Kudowa Zdrój, 17–19 listopada.

6.3. Działalność organizacyjna oraz przynależność do Stowarzyszeń:

- 2020-obecnie - jestem członkiem Zespołu ds. Sylabusów na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej.
- 2019-obecnie - jestem członkiem międzynarodowej grupy roboczej „Genotyping of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*” pod patronatem ISHAM.
- 2019-obecnie - jestem członkiem międzynarodowego towarzystwa ISHAM (International Society for Human and Animal Mycology).
- 2019-obecnie - jestem sekretarzem Rady Programowej Kierunku Weterynaria.
- 2019-obecnie - jestem sekretarzem Komisji ds. sprawozdawczości i informacji o działalności badawczej przy Radzie Dyscypliny Weterynaria (2019-2020).
- 2017-2019 - byłam członkiem Komisji Dziekańskiej ds. informacji o działalności naukowej Wydziału.
- 2017-2019 - byłam sekretarzem Wydziałowej Komisji ds. Nagród i Odznaczeń.
- 2014-2020 - byłam opiekunem roku studiów stacjonarnych English Division.
- 2012-2016 - byłam Członkiem Wydziałowej Komisji programowej kierunku Weterynaria.

- 2012 - byłam członkiem jury XIV Międzynarodowej Konferencji Studenckich Kół Naukowych i 29 Sejmiku SKN.
- 2012 - byłam sekretarzem Sekcji Nauk Podstawowych i Przedklinicznych podczas XIV Kongresu PTNW, 13-15.09.2012, Wrocław.
- 2011-2016 - byłam odpowiedzialna za sporządzenie corocznego sprawozdania Zakładu Mikrobiologii w zakresie działalności naukowej, w tym realizowanych badaniach statutowych jednostki, w celu ewaluacji działalności naukowej.

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

7.1 Omówienie osiągnięć naukowych innych, niż przedstawione do cyklu habilitacyjnego.

Od początku mojej pracy w Zakładzie Mikrobiologii, Katedry Patologii, brałam czynny udział w aktywnościach naukowych Zespołu, a także współpracowałam z pracownikami innych jednostek UPWr, przy czym mogę wyróżnić kilka obszarów badawczych:

1. Lekooporność bakteryjna oraz nowe preparaty przeciwdrobnoustrojowe.
2. Grzyby i grzybice u zwierząt, ze szczególnym uwzględnieniem czynników zjadliwości wybranych patogenów.
3. Rodzaj *Cryptococcus*.
4. Epidemiologia zakażeń oraz odpowiedź immunologiczna w chorobach zakaźnych koni.
5. Mikrobiota organizmu zwierzęcego oraz bakterie środowiskowe – występowanie, diagnostyka, chorobotwórczość.

Ad. 1

Jednym z ważniejszych problemów dzisiejszej medycyny, w tym medycyny weterynaryjnej, jest notowany wzrost oporności mikroorganizmów na preparaty antymikrobowe. By móc przeciwdziałać skutkom tego zjawiska bada się wzrost i charakter oporności oraz analizuje mechanizmy z tym związane. Ponadto, poszukuje się nowych preparatów przeciwdrobnoustrojowych, zarówno antybiotyków/chemioterapeutyków, jak i skutecznych dezynfektantów. W moich dotychczasowych badaniach dotyczących tematu oporności mikroorganizmów, działałam obukierunkowo. Podczas współpracy z Katedrą Biologii i Chorób Dzikich Zwierząt, Wydziału Higieny Weterynaryjnej i Ekologii, VFU BRNO, brałam udział w projekcie skupiającym się na analizie mechanizmów

odpowiedzialnych za zjawisko lekooporności u bakterii izolowanych z wód opuszczających oczyszczalnię ścieków miejskich (i szpitalnych) (1).

Wiadomo, iż ścieki stanowią doskonałe środowisko do przekazywania oporności pomiędzy komórkami bakterii. Obecność substancji odżywczych, duża biomasa bakteryjna, pozostałości antybiotyków i ich metabolitów, których stosowane w oczyszczalniach systemy nie są w stanie usunąć, wpływają na łatwość przekazywania genów oporności oraz selekcję bakterii lekoopornych i wielolekoopornych. Proces uzdatniania wody w oczyszczalni nie eliminuje wszystkich mikroorganizmów. W związku z czym, oczyszczone ścieki uwalniane do wód powierzchniowych mogą stanowić źródło zagrożenia dla ludzi i zwierząt, a także przyczyniać się do rozprzestrzeniania opornych bakterii w środowisku. [1-4]

W opisywanym projekcie skupiono się na ocenie oporności bakterii gramujemnych na antybiotyki β -laktamowe, szczególnie cefalosporyny. Wśród populacji pozyskanych w sposób wybiórczy pałeczek jelitowych opornych na cefotaksym, oporność na amoksyliny z kwasem klawulanowym i sulfonamidy stwierdzono u 46%, cyprofloksacynę u 45%, tetracyklinę 44%, sulfametoksazol z trimetoprimem 39% izolatów. Na streptomycynę, gentamycynę i chloramfenikol odpornych było odpowiednio 27%, 12% i 10% badanych szczepów bakterii. Produkcję ESBL wykryto u 60% izolatów. Wśród wybranych do dalszych analiz ESBL-pozytywnych izolatów *E. coli* (n=26), *Klebsiella pneumoniae* (n=4) oraz *K. oxytoca* (n=1) wykryto geny *bla*_{CTX-M-15} (23 izolaty), *bla*_{CTX-M-1} (2 izolaty) oraz *bla*_{CTX-M-14b} (1 izolat). Dodatkowo, u większości opisywanej populacji *E. coli* stwierdzono obecność genu *bla*_{OXA}. Wszystkie badane ESBL-pozytywne szczepy były odporne na co najmniej 2 antybiotyki. Wykryto następujące geny oporności: *sul1* i/lub *sul2* (sulfonamidy), *tet(A)* (tetracyklina), *strA* (streptomycyna), *aac(6')Ib-cr* lub *aac(3')III/qnrB1* (fluorochinolony), *cat* (amfenikole). U 23 z badanych izolatów wykryto integrony klasy 1 lub 2. Transmisja genów *bla*_{CTX-M} związana była z obecnością plazmidów koniugacyjnych FIA, FIB, Y, P, I, N, FIIK i FIA/FIB. Stwierdzono, że 73% posiadających gen *bla*_{CTX-M-15} i należących do grupy filogenetycznej B2 szczepów *E. coli* reprezentowało grupę klonalną O25b-ST131, której znaczenie na świecie wzrasta. Nasza praca była prawdopodobnie pierwszą wykazującą obecność tej grupy klonalnej wśród bakterii izolowanych ze ścieków, co mogło dać podstawę do stwierdzenia, że właśnie ścieki stanowią jedną z dróg szerzenia tej grupy bakterii.

Od wielu lat Zakład Mikrobiologii, w którym jestem zatrudniona, współpracuje z naukowcami z Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, w zakresie oceny niektórych właściwości biologicznych nowo syntezowanych związków chemicznych. Ocenie poddawane były między innymi kompleksy miedzi z ligandami aminofosfinowymi i fenantrolinami

(współpraca z zespołem dr hab. Radosława Starosty i dr Aleksandry Bykowskiej), a także kompleksy srebra(I) z PTA (1,3,5-Triaza-7-fosfaadamantan) i dodatkowymi ligandami o różnym charakterze chemicznym (współpraca z zespołem dr hab. Piotra Smoleńskiego i dr Sabiny Jaros). W moich badaniach oceniałam aktywność przeciwbakteryjną oraz przeciwdrożdżkową substancji w roztworach (ustalenie minimalnego stężenia hamującego; MIC) lub ich działanie kontaktowe, gdy badane związki tworzyły polimery (zgodnie ze zmodyfikowanym protokołem ASTM E2180 “Standard Testing Method for Determining Antimicrobial Activity in Polymeric or Hydrophobic Materials”). Badane związki różniły się w znacznym stopniu aktywnością wyrażoną w postaci wartości MIC, ale także działały inaczej w stosunku do poszczególnych grup badanych mikroorganizmów. I tak, związki miedzi skuteczniej hamowały bakterie gramododatnie i drożdżaki, natomiast kompleksy srebra były bardziej aktywne w stosunku do bakterii gramujemnych. Efektem podjętej współpracy jest 11 publikacji (2-12) i 2 doniesienia konferencyjne (13, 14).

1. Dolejska Monika, Frolkova Petra, **Florek Magdalena**, Ivana Jamborova, Michaela Purgertova, Kutilova Iva, Cizek Alois, Guenther Sebastian, Literak Ivan. CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella* spp. isolates in municipal wastewater treatment plant effluents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2011, 66, 2784-2790.
2. Starosta Radosław, **Florek Magdalena**, Król Jarosław, Puchalska Małgorzata, Kochel Andrzej. Copper(I) iodide complexes containing new aliphatic aminophosphine ligands and diimines - Luminescent properties and antibacterial activity. *New Journal of Chemistry*, 2010, 34, 1441-1449.
3. Kirillov Alexander M., Wieczorek Sabina W., Lis Agnieszka, Guadrs da Silva M. Fatima C., **Florek Magdalena**, Król Jarosław, Staroniewicz Zdzisław, Smoleński Piotr, Pombeiro Armando J. P. 1,3,5-Triaza-7-phosphaadamantane-7-oxide (PTA-O): New diamondoid building block for design of three-dimensional metal-organic frameworks. *Crystal Growth & Design*, 2011, 11, 2711-2716.
4. Starosta Radosław, Stokowa Kamila, **Florek Magdalena**, Król Jarosław, Chwiłkowska Agnieszka, Kulbacka Julita, Saczko Jolanta, Skąła Jacek, Jeżowska-Bojczuk Małgorzata. Biological activity and structure dependent properties of cuprous iodide complexes with phenanthrolines and water soluble tris (aminomethyl) phosphanes, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2011, 105, 1102-1108.
5. Starosta Radosław, Brzuszkiewicz Anna, Bykowska Aleksandra, Komarnicka Urszula, Bażanów Barbara, **Florek Magdalena**, Gadzała Łukasz, Jackulak Natalia, Król Jarosław, Marycz Krzysztof. A novel copper(I) complex, [CuI(2,2'-biquinoline)P(CH₂N(CH₂CH₂)₂O)₃] - Synthesis, characterisation and comparative studies on biological activity. *Polyhedron*, 2013, 50, 481-489.
6. Jaros Sabina W., Smoleński Piotr, Guedes da Silva Fatima C., **Florek Magdalena**, Król Jarosław, Staroniewicz Zdzisław, Pombeiro Armando J. P., Kirillov Alexander M. New silver BioMOFs driven by 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane-7-sulfide (PTA-S): synthesis, topological analysis and antimicrobial activity. *Cryst. Eng. Comm.*, 2013, 15, 8060-8064.
7. Starosta Jarosław, Bykowska Aleksandra, Kyzioł Agnieszka, Płotek Michał, **Florek Magdalena**, Król Jarosław, Jeżowska-Bojczuk Małgorzata. Copper(I) (pseudo)halide complexes with neocuproine and aminomethylphosphines derived from morpholine and thiomorpholine – in vitro cytotoxic and antimicrobial activity and the interactions with DNA and serum albumins. *Chemical Biology & Drug Design*, 2013, 82, 579-586.

8. Bykowska Aleksandra, Starosta Radosław, Brzuszkiewicz Anna, Bażanów Barbara, **Florek Magdalena**, Jackulak Natalia, Król Jarosław, Grzesiak Jakub, Kaliński Krzysztof, Jeżowska-Bojczuk Małgorzata. Synthesis, properties and biological activity of a novel phosphines ligand derived from ciprofloxacin, *Polyhedron*, 2013, 60, 23-29.
9. Jaros Sabina W., Guedes da Silva Fatima C., **Florek Magdalena**, Oliveira M. Conceicao, Piotr Smoleński, Pombeiro Armando J. P., Kirillov Alexander. Aliphatic dicarboxylate directed assembly of silver(I) 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane coordination networks: Topological versatility and antimicrobial activity. *Crystal Growth & Design*, 2014, 14, 5408-5417.
10. Jaros Sabina W., Guedes da Silva Fatima C., **Florek Magdalena**, Piotr Smoleński, Pombeiro Armando J. P., Kirillov Alexander. Silver(I) 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane coordination polymers driven by substituted glutarate and malonate building blocks: Self-assembly synthesis, structural features, and antimicrobial properties. *Inorganic Chemistry*, 2016, 55, 5886-5894.
11. Jaros Sabina W., Haukka Matti, **Florek Magdalena**, Guedes da Silva Fatima C., Kirillov Alexander, Piotr Smoleński. New Microbe Killers: Self-assembled silver(I) coordination polymers driven by a cage-like aminophosphine. *Materials*, 2019, 12, 1-10: 3353.
12. Jaros Sabina W., Krogul-Sobczak Agnieszka, Bażanów Barbara, **Florek Magdalena**, Poradowski Dominik, Nesterov S. Dymytrio, Śliwińska-Hill Urszula, Kirillov Alexander, Piotr Smoleński. Self-assembly and multifaceted bioactivity of a silver(I) quinolate coordination polymer. *Inorganic Chemistry*, 2021, 15435–15444.
13. Starosta Radosław, **Florek Magdalena**, Król Jarosław, Puchalska Małgorzata, Kochel Andrzej. Copper(I) iodide complexes with aromatic diimines and aliphatic aminophosphines: characterization, structures, antibacterial properties and study of interaction with pUC18 plasmid and bovine serum albumin. W: EUROBIC 9: 9th European Biological Inorganic Chemistry Conference: book of abstracts. Cebrat M., Kulon K. (red.), 2008, Wrocław, Uniwersytet Wrocławski, 306-306.
14. Jaros Sabina W., **Florek Magdalena**, Bażanów Barbara, Nesterov Dymytrio S., Kirillov Alexander, Smoleński Piotr. Bioactive aminophosphine coordination networks: synthesis, characterization and enhanced antimicrobial activity. W: AMBRA 2022: 1st International Conference on Advanced Materials for Bio-Related Applications. Wrocław, May 16-19, 2022. Book of abstracts, 2022, Institute of Low Temperature and Structure Research of the Polish Academy of Sciences, 44-44: O-09.

Piśmiennictwo:

1. Zhang, X., Zhang, T., Fang, H.H.P. Antibiotic resistance genes in water environment, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, 82, 397-414.
2. Ferreira da Silva, M., Vaz-Moreira, I., Gonzalez-Pajuelo, M., et al. Antimicrobial resistance patterns in *Enterobacteriaceae* isolated from an urban wastewater treatment plant, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2007, 60, 166-76.
3. Andersen, S.R. Effects of waste water treatment on the species composition and antibiotic resistance of coliform bacteria, *Curr. Microbiol.*, 1993, 26, 97-103.
4. Guenther, S., Grobbel, M., Beutlich, J., et al. Detection of pandemic B2-O25-ST131 *Escherichia coli* harbouring the CTX-M-9 extended-spectrum β -lactamase type in a feral urban brown rat (*Rattus norvegicus*), *J Antimicrob. Chemother.*, 2010, 65, 582-4.

Ad. 2

Ilość infekcji grzybiczych wykrywanych u ludzi i zwierząt na świecie wzrasta. Obserwowana sytuacja związana jest zarówno z rozwojem nowych technik diagnostycznych, wzrostem, wśród ludzi i zwierząt, liczby gospodarzy należących do grup ryzyka zakażeń oportunistycznych, a także zmianami klimatycznymi wpływającymi na możliwość zasiedlania przez grzyby nowych regionów, czy też wymuszającymi zmiany ewolucyjne tej grupy

mikroorganizmów. Mimo wciąż wzrastającej roli grzybów w medycynie, nasza wiedza dotycząca biologii tych organizmów, a także epidemiologii czy też patogenyzy grzybic wciąż jest niewystarczająca. Obiektem mojego zainteresowania od początku pracy naukowej są grzyby drożdżopodobne. Jest to duża i niezwykle zróżnicowana grupa grzybów odpowiedzialna za powodowanie u ludzi i zwierząt endogennych i egzogennych infekcji, głównie o charakterze oportunistycznym.

Moje badania skupione były przede wszystkim na analizie występowania, charakterystyce fenotypowej i genetycznej, a także ocenie czynników zjadliwości oraz lekowrażliwości drożdżaków izolowanych od psów. Pierwsza z opisanych w tej grupie publikacji była przeglądem bieżącej wiedzy na temat drożdżaków izolowanych z infekcji u psów. (1)

Kolejne prace były efektem analizy populacji grzybów drożdżopodobnych pozyskanych od psów, w ramach badań własnych. Materiał do badań zbierany był zarówno w grupie zwierząt zdrowych, jak i pochodził z rozmaitych przypadków klinicznych. Pozyskane izolaty drożdżaków identyfikowane były na podstawie cech hodowlanych oraz biochemicznych, a następnie poddawane ocenie potencjalnych czynników zjadliwości (aktywności enzymów hydrolitycznych, właściwości hydrofobowych, zdolności adhezji do komórek nabłonka policzka psa) oraz wrażliwości na wybrane preparaty przeciwgrzybicze. Wśród wyizolowanych grzybów dominował gatunek *Malassezia pachydermatis*, który stanowił 94,14% populacji pozyskanej od psów zdrowych i 91,56% u psów z grupy klinicznej. W obrębie tego gatunku zaobserwowano dwa typy morfologiczne. Typ I charakteryzował obfity wzrost na podłożu Sabourauda oraz biało-żółty kolor kolonii. Kolonie typu II na tym samym podłożu rosły skąpo, miały kolor żółto-brunatny i słabiej zawieszały się w płynie fizjologicznym. Pozostałe wyizolowane grzyby reprezentowały rodzaj *Candida*. W przypadku obu grup zwierząt dominowały tu grzyby z gatunku *C. albicans*, który stanowił 2,7% wszystkich drożdżaków u psów zdrowych i 2,45% izolacji z przypadku infekcji. W grupie zwierząt zdrowych izolowane były także grzyby z gatunków *C. famata* (obecnie *Debaromyces hansenii*; 0,45%), *C. glabrata* (obecnie species complex; 0,45%), *C. (Meyerozyma) guilliermondii* (0,9%), *C. tropicalis* (0,9%). Z materiału pochodzącego od psów chorych natomiast, wyizolowane zostały *C. parapsilosis* (obecnie species complex; 2,4%), *C. famata* (1,2%), *C. glabrata* (1,2%) oraz *C. tropicalis* (1,2%). Produkcja przez drożdżaki enzymów hydrolitycznych warunkuje pozyskiwanie substancji odżywczych oraz powoduje zmiany mikrośrodowiska bytowania grzybów, umożliwiając ich rozprzestrzenianie w organizmie gospodarza. W przeprowadzonym przy użyciu testu API ZYM (BioMerieux) doświadczeniu, wśród badanych enzymów

produkowanych przez *M. pachydermatis* odnotowano największą aktywność kwaśnej fosfatazy, esterazy (C4) i lipazy esterazowej (C8). Wykazano statystycznie wyższą aktywność β -glukozydazy u szczepów pochodzących od zwierząt zdrowych. Aktywność aryamidazy leucynowej wytwarzanej przez szczepy typu I była statystycznie istotnie wyższa niż typu II. Badane izolaty należące do rodzaju *Candida* wykazały najsilniejszą aktywność hydrolityczną aryamidazy leucynowej, esterazy (C4) i N-acetylo- β -glukozyloamidazy. Nie znaleziono różnic statystycznie istotnych między izolatami pochodzącymi od zwierząt chorych i zdrowych, natomiast w grupie non-albicans wykazano statystycznie wyższą aktywność fosfatazy kwaśnej, niż ta obserwowana u szczepów *C. albicans*. Kolejną grupą badań było określanie hydrofobowości i zdolności adhezji komórek grzybów. Oba czynniki związane są z przyleganiem do komórek gospodarza, niezbędnym do kolonizowania i wreszcie inwazji do tkanek. Hydrofobowość jest odwracalnym etapem poprzedzającym adhezję i bezpośrednio wpływa na zdolność adhezji komórek mikroorganizmów. W zastosowanym do ustalenia stopnia hydrofobowości teście wysalania SAT (Salt Aggregation Test), w zależności od zastosowanego w doświadczeniu środowiska (bufor fosforanowy 0,02 i 0,002 mol/L oraz 0,9% NaCl), 7 do 74% izolatów *M. pachydermatis*, wykazało silne właściwości hydrofobowe, aktywność słabą obserwowano u 13-53%, a jej brak u 13-42%. Grzyby te najsilniej agregowały w środowisku 0,9% NaCl. Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic właściwości hydrofobowych między szczepami pochodzącymi od psów zdrowych i chorych. Natomiast w przypadku porównania typu I i II widać było różnice, w zależności od roztworu, w jakim zawieszano grzyby. Badane izolaty z rodzaju *Candida* cechowały się statystycznie niższą hydrofobowością niż *M. pachydermatis*. Nie wykazano wśród nich istotnych różnic w zależności od gatunku lub pochodzenia (psy chore/zdrowe). Zdolność adhezji oceniano licząc średnią liczbę komórek drożdżaka przylegających do 1 komórki nabłonka policzka psa, po półgodzinnej koinkubacji obu populacji komórek. Średnia liczba komórek *M. pachydermatis* przylegających do jednej komórki nabłonka wyniosła 17. Średnia liczba przylegających komórek *M. pachydermatis* typu I i II wynosiła odpowiednio 18 i 13. Izolaty typu I wykazywały większe zdolności adhezyjne (istotne statystycznie na poziomie $p < 0,01$). Szczepy pochodzące od zwierząt chorych charakteryzowały się znamienne wyższą adhezją niż te, izolowane od zwierząt zdrowych (średnia odpowiednio 18 i 15 komórek). Średnia liczba komórek *Candida* spp. przylegających do 1 komórki nabłonka wynosiła 17. Odnotowano statystycznie znamienne różnicę adhezji szczepów gatunku *C. albicans* względem pozostałych gatunków z tego rodzaju oraz pochodzących od zwierząt zdrowych i chorych. Następnym krokiem analizy badanej populacji grzybów była ocena lekowrażliwości, badanie przeprowadzone zostało metodą

dyfuzyjno-krażkową. Wszystkie badane szczepy *M. pachydermatis* wrażliwe były na klotrimazol, itrakonazol, ketokonazol, mikonazol i tiokonazol. Wszystkie były też odporne na 5-fluorocytozynę. Wrażliwość omawianych grzybów na działanie amfoterycyny B, flukonazolu, nystatyny i pimarycyny wyniosła odpowiednio 98%, 38%, 27% i 7%. Nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych wrażliwości na badane preparaty pomiędzy typem I i II oraz szczepami pochodzącymi od zwierząt zdrowych i chorych. Ocena lekooporności grzybów z rodzaju *Candida* wykazała najwyższą wrażliwość tych mikroorganizmów na klotrimazol i tiokonazol (90%), a następnie mikonazol (75%). Zaobserwowano oporność badanych grzybów na pimarycynę (100%) i nieco niższą w stosunku do nystatyny (70%). Pozostałe preparaty były skuteczne w 15-55%. Nie stwierdzono różnic wrażliwości na badane antymikotyki między izolatami pochodzącymi od zwierząt chorych i zdrowych, a także reprezentującymi różne gatunki *Candida*. (2-7)

Wykryte wcześniej różnice fenotypowe dotyczące typu I i II *M. pachydermatis* spowodowały, iż grupa wybranych izolatów (n=20) reprezentujących każdy z typów, poddana została dalszemu badaniu. W pierwszej kolejności przeprowadzono analizę białek przy użyciu metody SDS-PAGE. Otrzymano 14 frakcji białkowych, z których tylko jedna (63 kDa) wystąpiła u wszystkich izolatów. Wyodrębniono też prążki charakterystyczne dla każdego z typów. Prążki o masie 82, 52, 50, 37, 28 oraz 21,5 kDa wystąpiły u typu I, natomiast frakcje 30 i 25 kDa u izolatów typu II (8). W kolejnym badaniu DNA izolowane ze szczepów użytych w poprzednim doświadczeniu, wykorzystano w metodzie ADSRRS-fingerprinting. Metoda pozwoliła na wyróżnienie wśród badanych izolatów trzech grup. Do grupy A należało 9 z 10 izolatów typu I. W grupie B znalazło się 9 z 10 szczepów typu II. Pozostałe 2 badane izolaty należały do grupy C. Wzór elektroforetyczny grupy C wykazał obecność prążków charakterystycznych zarówno dla grupy A oraz B, a także kilka unikalnych dla grupy C (9).

Przeprowadzone badania pozwoliły ocenić prewalencję grzybów drożdżopodobnych izolowanych od psów. Wykazały heterogenność fenotypową i genetyczną w obrębie gatunku *M. pachydermatis*. Uzyskana różnica adhezji szczepów *M. pachydermatis* pochodzących od psów zdrowych i chorych, może wskazywać na znaczenie tego czynnika zjadliwości w patogenezie infekcji. Natomiast znaczne różnice hydrofobowości między rodzajami *Malassezia* i *Candida* wskazują na odmienne mechanizmy patogenezy zakażeń powodowanych przez oba rodzaje.

Jestem także współautorem pracy poruszającej problem roli grzybów drożdżopodobnych w zapaleniu wymienia bydła. Badanie mikrobiologiczne próbek pochodzących z 136 ćwiartek gruczołu mlekowego krów, u których rozpoznano *mastitis*, wykazało obecność drożdżaków w

28 próbkach. Uzyskane izolaty rozpoznane zostały jako *Candida krusei* (obecnie *Issatchenkia orientalis*), *C. kefyr* (*Kluyveromyces marxianus*), *C. lambica* (*Pichia fermentas*), *C. (Diutina) rugosa*, *C. tropicalis*, *C. inconspicua* i *C. (Yarrowia) lipolytica*. Ponadto zidentyfikowano izolaty należące do gatunku *Trichosporon (Cutaneotrichosporon) cutaneum* oraz szczepy *Geotrichum* spp. Badane izolaty wykazały wrażliwość na tiokonazol (85,7%), klotrimazol (78,65%), mikonazol (71,4%), 5-fluorocytozynę (60,7%), itraconazol (50%), ketokonazol (46,4%), flukonazol (25%), nystatynę (3,6%). Grzyby nie wykazywały wrażliwości na natamycynę i amfoterycynę B, natomiast odpowiednio 14,3% i 25% z nich było średnio wrażliwe na owe preparaty (10, 11).

W moim dorobku związanym z omawianą grupą tematyczną, znalazły się także dwa opisy przypadków klinicznych. Pierwszy z nich omawia diagnostykę i terapię u 14-miesięcznego American Staffordshire teriera, u którego, mimo prób leczenia, przez kilka miesięcy utrzymywały się zmiany skórne, kliniczne przypominające zapalenie mieszków włosowych na tle infekcji bakteriami z rodzaju *Staphylococcus*. Badanie zeszkobin skóry oraz ropnej zawartości zmian skórnych wykazało współistniejącą infekcję *Demodex canis* oraz *C. albicans*. Pies był leczony amitrazą, stosowaną miejscowo co 7-10 dni przez 6 tygodni, oraz ketokonazolem, stosowanym doustnie w dawce 15 mg/kg dwa razy dziennie przez 14 dni, a następnie kremem z mikonazolem. Po zastosowaniu leczenia poprawę stanu pacjenta uzyskano po 4 tygodniach, natomiast całkowity powrót do zdrowia - po 8 tygodniach (12). Kolejny przypadek dotyczył 9-miesięcznego owczarka kaukaskiego, który trafił do pracowni kardiologicznej z objawami apatii i osłabienia, wodobrzuszem, wodogłowiem i częstoskurczem komorowym. Podczas próby kardiowersji farmakologicznej doszło do zatrzymania krążenia. Sekcyjnie, pośród innych zmian anatomopatologicznych, w tkankach (wokół płucnych naczyń krwionośnych, pod torebką wątroby i nerek oraz wewnątrz naczyń krwionośnych we wszystkich narządach wewnętrznych) zaobserwowano liczne nierozgałęzione, septowane strzępki grzybów. Obecność grzybów potwierdzono w badaniu fluorescencyjnym z użyciem jodku propidyny. Niestety, ze względu na brak wcześniejszego podejrzenia podłoża infekcyjnego, zabezpieczono jedynie próbki do badania histopatologicznego, co uniemożliwiło izolację patogenu. Podjęto próby izolacji ze skrawków utrwalonych formaliną DNA i sekwencjonowania regionu ITS, jednak degradacja materiału genetycznego uniemożliwiła identyfikację patogenu (13).

1. Staroniewicz Zdzisław, Florek Magdalena, Król Jarosław. Grzyby drożdżopodobne w zakażeniach u psów. *Mikologia Lekarska*, 2008, 15, 176-179.

2. **Florek Magdalena**, Król Jarosław, Staroniewicz Zdzisław. Grzyby z rodzaju *Candida* izolowane od psów. W: XIV Kongres PTNW : Nauka praktyce. Winiarska-Grabosz Elżbieta (red.), 2012, Wrocław, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, 616-616.
3. **Florek Magdalena**, Staroniewicz Zdzisław, Król Jarosław. Enzymatic activity and susceptibility to antifungal agents of the yeast-like fungi isolated from dogs. *Mikologia Lekarska*, 2004, 11, nr suppl. 1/04, 81-81.
4. Staroniewicz Zdzisław, **Florek Magdalena**, Król Jarosław. Właściwości hydrofobowe drożdżaków z rodzaju *Candida* i *Malassezia* izolowanych od psów. *Mikologia Lekarska*. 2008, 15, 67-71.
5. Staroniewicz Zdzisław, **Florek Magdalena**, Król Jarosław, Bażanów Barbara, Właściwości hydrofobowe szczepów z rodzaju *Malassezia* i *Candida* izolowanych od psów. XIII Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych „Od nauki do praktyki” 2008, 436-436, streszczenie.
6. **Florek Magdalena**, Staroniewicz Zdzisław, Król Jarosław, Bażanów Barbara. Zdolność adhezji komórek szczepów *Malassezia pachydermatis* i *Candida* spp. izolowanych od psów. XIII Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych „Od nauki do praktyki” 2008, 416-416, streszczenie.
7. **Florek Magdalena**, Król Jarosław, Staroniewicz Zdzisław, Barbara Bażanów. Adhesion of *Malassezia pachydermatis* of different growth type to canine epithelial cells. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2014, 17, 365-366.
8. Zdzisław Staroniewicz, **Magdalena Florek**, Stefaniak Tadeusz, Galli Józef, Jarosław Król. Charakterystyka rozdziału białek szczepów *Malassezia pachydermatis* w żelu poliakrylamidowym. *Mikologia Lekarska*, 2006, 13, nr suppl. 1, s. 81-81, SPL.18.
9. **Florek Magdalena**, Staroniewicz Zdzisław, Król Jarosław. Analiza genomowego DNA szczepów *Malassezia pachydermatis* metodą ADSRRS-fingerprinting plus. *Mikologia Lekarska*, 2006, 13, nr suppl. 1, s. 80-80, SPL.16.
10. Staroniewicz Zdzisław, Włodarczak Artur, **Florek Magdalena**, Król Jarosław. Flora grzybicza w mastitis u krów i jej wrażliwość na antymikotyki. *Mikologia Lekarska*, 2006, vol. 13, nr suppl. 1, s. 80-81, SPL.17.
11. Staroniewicz Zdzisław, Włodarczak Artur, **Florek Magdalena**, Król Jarosław. Flora grzybicza w mastitis u krów i jej wrażliwość na antymikotyki. *Mikologia Lekarska*, 2007, 14, 257-259.
12. Król Jarosław, **Florek Magdalena**, Pliszczak-Król Aleksandra, Staroniewicz Zdzisław. Cutaneous candidiasis in a dog with demodicosis - case report. *Medycyna Weterynaryjna*, 2011, 67, 496-498.
13. Janus Izabela, Noszczyk-Nowak Agnieszka, **Florek Magdalena**, Kuropka Piotr, Dzimira Stanisław. Canine systemic mycosis with sudden onset heart failure – a case report. 1-3 s., 2021, 45th World Small Animal Veterinary Association Congress & the 26th Federation of European Companion Animal Veterinary Associations Congress 2021, streszczenie.

Ad. 3

Kolejnym tematem badawczym, który niejako jest kontynuacją mojego zainteresowania grzybami drożdżopodobnymi i przyczynił się do powstania cyklu publikacji będącego podstawą wniosku habilitacyjnego, jest rodzaj *Cryptococcus*. Moje pierwsze opracowania dotyczące omawianego tematu miały charakter popularyzatorski. W książce „Mikologia – co nowego?” pod redakcją prof. dr hab. Eugeniusza Barana, w rozdziale „Grzybice w praktyce weterynaryjnej” byłam autorką (1) części poświęconej zakażeniom psów i kotów wywoływanych przez grzyby z rodzaju *Cryptococcus*, w której przedstawiałam problematykę chorobotwórczości, epidemiologii, diagnostyki oraz zasad leczenia kryptokokozy u zwierząt

towarzyszących. Kolejne opracowanie (2) miało charakter przeglądowy, przedstawiający zmiany w postrzeganiu patogenów z kompleksów *C. neoformans/C. gattii* w świetle badań powstałych po 2000 roku. Dużo miejsca poświęciłam tu metodzie MLST, jej standaryzacji dla *Cryptococcus* i wpływie, jaki ma ona na poznanie epidemiologii molekularnej omawianych grzybów.

Grzyby należące do kompleksów gatunków *C. neoformans/C. gattii* w obecności zawartych w środowisku związków fenolowych i polifenolowych mają zdolność produkcji melaniny, przy udziale enzymu lakazy. Zjawisko to wykorzystywane jest w komponowaniu podłoży różnicujących, na których kolonie omawianych grzybów przybierają barwę od jasnobrązowej do prawie czarnej. Podłoża różnicujące rutynowo stosowane do izolacji CNGSC zawierają wyciąg z nasion olejarki abisyńskiej (podłoże Staiba) lub kwas kawowy (*caffeic acid cornmeal agar*, CACA). Problemem związanym z izolacją szczepów środowiskowych grzybów z rodzaju *Cryptococcus* z omawianej grupy, jest obecność w badanym materiale szybko rosnących grzybów saprofitycznych, które w czasie niezbędnym do uzyskania wzrostu kryptokoków (zwykle 48-96 h) przerastają podłoża, uniemożliwiając odzyskanie poszukiwanych drożdżaków. Zahamowanie/spowolnienie wzrostu pleśni na podłożach dla grzybów zwykle uzyskuje się przez dodatek cykloheksymidu, który jednak jest również toksyczny dla kryptokoków. Dodatkami proponowanymi dla zahamowania wzrostu pleśni przy izolacji grzybów z rodzaju *Cryptococcus* z próbek środowiskowych są róż bengalski, czy też toksyczne dichloran i bisfenol. W mojej pracy postanowiłam przebadać grupę wyciągów roślinnych zawierających w składzie znaczne ilości związków fenolowych i polifenolowych, i ocenić ich przydatność w podłożach do izolacji CNGSC (3). W badaniach użyte zostały wyciągi uzyskane z: suszu z bazylii pospolitej, szalwii lekarskiej, herbaty zielonej i czarnej, tymianku pospolitego, estragonu, kurkumy, a także z owoców banana, gruszy, aronii czarnej oraz liści glistnika jaskółcze ziele i pokrzywy zwyczajnej. Stosując podłoża zawierające obok wyciągu roślinnego glukozę 1 [g/l], chloramfenikol 0,05 oraz agar bakteriologiczny 20, oceniano szybkość wzrostu i stopień melanizacji kolonii CNGSC, stopień zahamowania wzrostu pleśni w próbkach środowiskowych oraz obecność/brak pigmentu w koloniach *C. albicans* i *Cryptococcus albidus*. Obserwacje przeprowadzano każdorazowo po 24, 48 i 72 h od momentu inokulacji podłoża. Stopień melanizacji i zahamowania wzrostu pleśni na podłożach zawierających badane wyciągi roślinne, porównywany był każdorazowo z uzyskanym na podłożu Staiba, bez lub z dodatkiem różu bengalskiego. Melanizacja kolonii badanych szczepów wzorcowych pojawiała się w czasie 24-48 h (przy próbkach środowiskowych 48-72 h), w zależności od stosowanego wyciągu roślinnego. Najintensywniejsze zabarwienie kolonii

powodowała obecność wyciągu z szałwii, bazylii, estragonu, tymianku i banana. Najsilniej hamującymi pleśnie okazały się być kurkuma, szałwia oraz bazylia. Żaden z badanych wyciągów nie wpływał na zmianę zabarwienia kolonii *C. albicans*. *C. albidus* w większości przypadków zachowywał swój naturalny kremowy kolor, jednakże w obecności wyciągu z zielonej herbaty i aronii nieznacznie zmieniał zabarwienie. Doświadczenie wykazało, że dostępne i tanie surowce roślinne, takie jak susz z bazylii lub szałwii, mogą być stosowane jako dodatki do podłoża pozwalających na izolację CNGSC z próbek środowiskowych, powodując silną melanizację grzybów i jednocześnie hamując wzrost pleśni.

Grzyby z rodzaju *Cryptococcus* typowo są haplontami, jakkolwiek w wyniku procesu hybrydyzacji mogą tworzyć diploidalne lub aneuploidalne hybrydy. W odniesieniu do kompleksów CNSC/CGSC udowodniono występowanie hybryd wewnątrzvariantowych (VNI/VNII, VNII/VNB), międzyvariantowych (VNI/VNIV, VNII/VNIV, VNIII oraz różne kombinacje między typami molekularnymi VG), czy wreszcie międzygatunkowych (VN/VG). Najlepiej poznanymi wśród hybryd tworzonych przez grzyby z CNSC/CGSC są te, należące do MMT VNIII (hybrydy AD). Większość z nich jest heterozygotyczna, lecz nie dla wszystkich alleli, co może być spowodowane konwersją genu lub utratą chromosomu. Doświadczalnie wykazano różnice zjadliwości pomiędzy szczepami haploidalnymi, a różnymi typami hybryd. Zbadano między innymi, że hybrydy w porównaniu z izolatami haploidalnymi były w stanie wytworzyć podczas infekcji większą otoczkę, która u kryptokoków stanowi jeden z najważniejszych czynników zjadliwości. Wykazano także, iż hybrydy były bardziej odporne na antymikotyki, niż haploidalne szczepy, z których powstały (A i D). Udowodniono także wpływ typu koniugacyjnego na zjadliwość poszczególnych typów hybryd – hybrydy posiadające typ koniugacyjny a, charakteryzowały się większą zjadliwością. Interesującym jest fakt szczególnie częstego występowania, w porównaniu z resztą świata, infekcji z udziałem hybryd AD u pacjentów w Europie – nawet do 30%. [1-5]

Techniką o szerokim zastosowaniu w przypadku CNSC/CGSC jest MLST. Według konsensusu ustalonego w 2009 roku przez członków grupy roboczej „Genotyping of *C. neoformans* and *C. gattii*” (ISHAM) dla omawianych grzybów, typowanie odbywa się poprzez analizę sekwencji określonych fragmentów genów *CAP59*, *GPD1*, *IGS1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1* oraz *URA5* [6]. Wprowadzenie standaryzacji metody MLST dla grzybów z kompleksów *C. neoformans/C. gattii* w dużym stopniu ułatwiło badanie biologii, filogenezy oraz epidemiologii związanych z omawianymi mikroorganizmami. Przyczyniło się ono w dużej mierze do poznania haploidalnej populacji badanych patogenów. Jednakże w przypadku hybryd, metoda

ta nie pozwalała na analizę, gdyż użycie standardowych, niespecyficznych dla danego typu molekularnego starterów, wiązało się z uzyskiwaniem mieszanego produktu PCR.

W związku z zainteresowaniem, jakie wśród naukowców budzą hybrydy VNIII/AD, w 2020 roku Cogliati i wsp. [7] przedstawili schemat MLST pozwalający na niezależną amplifikację obu rodzicielskich alleli (pochodzących do rodzica o serotypie A lub D), dla wszystkich *loci* badanych w klasycznym schemacie MLST. W celu walidacji metody, w ramach założonej przez dr Massimo Cogliatiego (Department of Biomedical Sciences for Health, Università degli Studi di Milano, Milano, Italy) międzynarodowej grupy SCrEEN Project, zajmującej się badaniami nad CNSC/CGSC, powstał projekt „Cryptococcus Hybrids Sequencing (CryHs)”. Analizie z wykorzystaniem nowego schematu MLST poddano 50 izolatów hybryd (VNIII/AD oraz innych będących efektem hybrydyzacji MMT VNI/VNB/VNII oraz VNIV) (4).

Wykryto 32 hybrydowe genotypy tworzące trzy odrębne klastry. W dwóch z nich niezależnie od pochodzenia, izolaty grupowały się w zależności od typu koniugacyjnego, natomiast osobno zgrupowały się szczepy pochodzące z Wybrzeża Kości Słoniowej. Ze względu na naturalną, w przypadku hybryd omawianych grzybów, tendencję do utraty alleli, dla niektórych izolatów nie udało się ustalić typów allelicznych wszystkich siedmiu badanych loci. Prowadzono także analizę profili MLST osobno dla alleli rodzicielskich A oraz D. Ciekawym spostrzeżeniem był fakt, że choć serotyp A może być reprezentowany przez MMT VNI, VNB oraz VNII, ten ostatni nie został zidentyfikowany w żadnej z badanych hybryd. Ustalono, że w grupie badanych hybryd większość alleli A pochodziła od szczepów haploidalnych spotykanych często zarówno wśród izolatów środowiskowych, jak i klinicznych. Z kolei analiza alleli D wykazała, że większość uzyskanych typów allelicznych nie była wcześniej rozpoznana wśród szczepów haploidalnych, więc ma prawdopodobne pochodzenie środowiskowe, co wynika większą zmiennością izolatów VNIV pochodzenia środowiskowego.

Uzyskane pierwsze wyniki analizy hybryd nową metodą MLST sugerują jej użyteczność dla szerszej analizy badanej populacji, co pozwoli na zgromadzenie wiedzy dotyczącej tej formy grzyba, która wymykała się możliwościom do tej pory stosowanego schematu MLST.

Moim udziałem w projekcie CryHs była izolacja i identyfikacja 4 środowiskowych hybryd AD. We współpracy z dr hab. Urszulą Nawrot (UM we Wrocławiu) udało się pozyskać kliniczną hybrydę, którą zidentyfikowałam, jako należącą do typu molekularnego VNI/VNIV. Polskie hybrydy stanowiły 10% populacji badanych w projekcie. Brałam też udział ustalaniu typów sekwencyjnych alleli rodzicielskich hybryd.

1. Staroniewicz Zdzisław, Król Jarosław, **Florek Magdalena**. Grzybice w praktyce weterynaryjnej, W: Mikologia - co nowego? Baran Eugeniusz (red.), 2008, Wrocław, Cornetis, 138-157.
2. **Florek Magdalena**. *Cryptococcus* – nowy wiek, nowe wyzwania., *Forum Zakażeń*, 2016, 7, 400-401.
3. **Florek Magdalena**. Zastosowanie wyciągów roślinnych w podłożach do izolacji środowiskowych szczepów grzybów kompleksu *Cryptococcus neoformans/C. gattii*. W: XV Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych : „Per scientiam ad salutem animalium et hominum” : Materiały kongresowe, 2016, Morspol, 129-129.
4. Cogliati Massimo, Chen Min, Xu Jianping, Hitchcock Megan, Kwon Chung June, Yang Dong-Hoon, Rickerts Volker, Desnos Ollivier Marie, Silva Joao Inacio, Meyer **Wieland**, **Florek Magdalena**, Nawrot Urszula, Escandon Patricia, Puime Andrés, Roger Frederic, Bertout Sébastien: S8.5c MLST genotyping and phylogenetics of AD-hybrids. *Medical Mycology*, 60, 2022, vol. 60, nr Supplement 1, s.29-29, Numer artykułu: S8.5c.

Piśmiennictwo:

1. Aminnejad, M., Cogliati, M., Duan, S., Arabatzis, M., Tintelnot, K., Castañeda, E., et al. Identification and characterization of VNI/VNII and novel VNII/VNIV hybrids and impact of hybridization on virulence and antifungal susceptibility within the *C. neoformans/C. gattii* species complex. *PLoS ONE*, 2016, 11, e0163955.
2. Lengeler, K.B., Cox, G.M., Heitman, J. Serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans* are diploid or aneuploid and are heterozygous at the mating-type locus. *Infect Immun.*, 2001, 69, 115-22.
3. Cogliati, M., Barchiesi, F., Spreghini, E., Tortorano, A.M. Heterozygosity and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* AD-hybrid isolates. *Mycopathologia*, 2012, 137, 347-57.
4. Xu, J., Luo, G., Vilgalys, R.J., Brandt, M.E., Mitchell, T.G. Multiple origins of hybrid strains of *Cryptococcus neoformans* with serotype AD. *Microbiology*, 2002, 148, 203-12.
5. Barchiesi, F., Cogliati, M., Esposto, M., Spreghini, E., Schimizzi, A., Wickes, B., et al. Comparative analysis of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* serotypes A, D and AD in murine cryptococcosis. *J Infect.*, 2005, 51, 10-16.
6. Meyer, W., Aanensen, D.M., Boekhout, T., Cogliati, M., Diaz, M.R., Esposto, M.C., Fisher, M., Gilgado, F., Hagen, F., Kaocharoen, S., et al. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med. Mycol.*, 2009, 47, 561–570.
7. Cogliati, M., Roger, F., Meyer, W., Robert, V., Bertout, S. New multilocus sequence typing primers to enable genotyping of AD hybrids within the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Med Mycol.*, 2020, 58, 1005-1009.

Ad. 4

Moje najwcześniejsze badania dotyczące chorób zakaźnych koni, były wynikiem współpracy z pracownikami i doktorantami Zakładu Immunologii i Prewencji Weterynaryjnej naszego Wydziału, prof. dr hab. Tadeuszem Stefaniakiem i dr Anną Włodarczyk-Szydłowską. W przypadku koni, głównym źródłem przeciwciał dla noworodka jest siara jego matki. Zawiera ona głównie przeciwciała klasy IgG oraz mniejsze ilości IgM i IgA. Uzyskanie przez źrebię biernego zabezpieczenia immunologicznego, dzięki transferowi jelitowemu, pozwala na skuteczną ochronę noworodka w pierwszych tygodniach życia i pozwala na prawidłowe dojrzewanie własnych mechanizmów odporności. Celem badań była ocena poziomu przeciwciał swoistych, skierowanych przeciwko patogenom obecnym w środowisku zwierząt. Na podstawie badania mikrobiologicznego głębokich wymazów z nosa oceniano, na jakie patogeny środowiskowe ekspozowane były klacze i źrebięta. Z wymazów wyizolowano

bakterie z gatunków *Staphylococcus* (obecnie *Mammallicoccus*) *sciuri*, *S. xylosus*, *S. aureus*, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *Enterobacter* (obecnie *Pantoea*) *agglomerans*. Dodatkowo, do badań dołączono pochodzące z kolekcji Zakładu Mikrobiologii izolaty *Salmonella* Typhimurium i *Rhodococcus equi*, bakterii z serotypów/gatunków mających duże znaczenie w okresie okołoporodowym oraz okresie wychowu źrebiąt. Następnie ustalano poziom przeciwciał klasy IgM i IgG swoistych dla badanych patogenów, w różnych typach materiału pobranego od analizowanych grup zwierząt. W pierwszym doświadczeniu (1, 2) oceniano poziom przeciwciał swoistych przeciwko wyizolowanym bakteriom w próbkach surowicy klaczy-matek i źrebiąt (36-48h po porodzie) oraz w próbkach siary (zdojonej w czasie do 30 minut po porodzie), zbieranych w ciągu 4 kolejnych lat (1999-2002). W surowicy badanych klaczy najwyższe średnie wartości OD dla przeciwciał klasy IgM obserwowano wobec *S. Typhimurium*, *S. sciuri* i *S. aureus*. Najniższe natomiast, wobec *R. equi* i *E. agglomerans*. W klasie IgG poziomy przeciwciał wobec badanych patogenów wykazywały duże zróżnicowanie. Najwyższe czteroletnie średnie stwierdzono w przypadku *S. sciuri*, *S. equi* subsp. *zooepidemicus* oraz *R. equi*. Najniższe – ponownie dla *E. agglomerans*. W sianie najwyższe średnie wartości OD przeciwciał swoistych odzwierciedlały sytuację obserwowaną w surowicy klaczy-matek. Natomiast w surowicy źrebiąt ocena zmiany ilości swoistych przeciwciał po absorpcji immunoglobulin, wykazała najwyższe średnie poziomy wobec *S. Typhimurium*, *S. equi* subsp. *zooepidemicus*. W kolejnym etapie doświadczenia (1, 3), w próbkach surowicy źrebiąt (pobierane w godzinach 0 i 36-48 po porodzie, w 3-4 tygodniu oraz 9 miesiącu życia) i ich matek (pobierane 36-48 h po porodzie) oznaczono poziom białka całkowitego, gamma globulin oraz poziom przeciwciał swoistych wobec badanych drobnoustrojów, w klasach IgM i IgG. Na podstawie wartości OD przeciwciał swoistych klasy IgM i IgG, wykreślono krzywe obrazujące narastanie, w surowicy źrebiąt, odpowiedzi humoralnej wobec badanych drobnoustrojów. Uzyskane krzywe różniły się między poszczególnymi gatunkami bakterii, a także szczepami tego samego gatunku. Odmienna odpowiedź immunologiczna wobec szczepów tego samego gatunku mogła być spowodowana dużą różnorodnością antygenową izolatów. Krzywe uzyskane dla *S. aureus* i *S. sciurii* oraz *S. Typhimurium* mogły wskazywać na duży napór antygenowy tych drobnoustrojów w środowisku.

Kolejna grupa prac dotyczy chorób wirusowych koni. Pierwszym zagadnieniem była tu epidemiologia zakażeń wirusami zapalenia tętnic koni (EAV) i Zachodniego Nilu (WNV) (4, 5). Sytuacja dotycząca występowania infekcji wymienionymi wirusami w Polsce, oceniana była w grupie koni rasowych. Na podstawie wyników badań surowicy, z zastosowaniem testu

seroneutralizacji i hamowania hemaglutynacji, w badanej populacji zwierząt (n=307) wykryto przeciwciała przeciwko EAV u 27% i przeciwko WNV u 0,65% osobników.

Od kilku dekad, w Zakładzie będącym moim miejscem zatrudnienia, jednym z głównych tematów badawczych są wirusy abortogenne koni, a w szczególności EAV oraz herpeswirusy koni typu 1 i 4 (EHV 1/4). Badania poronionych płodów końskich przeprowadzone w naszym Zakładzie w latach 1977-2010, pozwoliły nam na retrospektywną analizę sytuacji epidemiologicznej ronień związanych z infekcjami EHV-1 (6). Materiał stanowiący 452 poronionych płodów końskich przesłanych do Zakładu Mikrobiologii naszego Wydziału w opisywanym okresie, pochodził z gospodarstw zlokalizowanych na terenie całej Polski. Po izolacji w hodowlach komórkowych, uzyskane szczepy wirusów identyfikowane były testem immunofluorescencji bezpośredniej. Obecność EHV-1 potwierdzona została w przypadku 23,5% przebadanych płodów. Występowanie ronień na tle infekcji omawianym wirusem miało charakter sezonowy. Ronienia najczęściej występowały między grudniem a lutym, a ich liczba w cyklu rocznym stopniowo spadała do czerwca. Dla analizy statystycznej badany okres podzielono na dekady (1977-90, 1991-2000, 2001-2010). Obserwowano cykliczne zmiany odsetka ronień związanych z EHV-1 – co 7-9 lat ilość izolacji wirusa spadała do 0% (1980-1983, 1990-1991, 1998, 2007-2008). Natomiast momenty dużego wzrostu odsetka ($\geq 50\%$) były nieregularne i dotyczyły lat 1978, 1984, 1996, i 2000. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic sytuacji epidemiologicznej w poszczególnych dekadach.

Koń huculski (*Equus caballus*) jest jedną z prymitywnych ras koni, która znana jest ze swojej żywotności, odporności na działanie zewnętrznych warunków środowiskowych i dobrego zdrowia, w tym odporności na choroby zakaźne. Niewiele jest wiadomo na temat epidemiologii dotyczącej chorób wirusowych u przedstawicieli tej rasy. Obiektem badań (7) było stado liczące 20 osobników, utrzymywane w warunkach częściowej izolacji, dodatkowo nie poddawane profilaktycznym zabiegom lekarsko-weterynaryjnym. Celem pracy była ocena statusu immunologicznego stada w odniesieniu do najczęściej występujących wirusów powodujących choroby koni (EAV, EHV-1, wirus zapalenia nosa koni typu A (ERAV), wirus grypy koni typu A (EIV)), a także próba stwierdzenia w środowisku obecności arbowirusów infekujących konie (wirus Usutu (USUV), WNV, wirus niedokrwistości zakaźnej koni (EIAV)). Podjęto także próbę izolacji wybranych wirusów z materiału klinicznego (wymazy z nosa). Badanie wirusologiczne nie pozwoliło na stwierdzenie obecności w materiale żadnego z badanych wirusów (EAV, EHV-1, ERAV i EIV). W badanych próbkach surowicy nie wykryto przeciwciał skierowanych przeciwko EAV, WNV i EIAV. Natomiast przeciwciała przeciwko pozostałym z badanych wirusów wykryte były u następującego odsetka badanych zwierząt:

ERAV 5%, USUV 25%, EHV-1 i EIV(H3N) 60%, EIV(H7N7) 65%. Ciekawym wynikiem była stosunkowo wysoka częstotliwość występowania przeciwciał przeciw EIV(H7N7), gdyż od ostatniego wybuchu grypy koni spowodowanej przez omawiany serotyp w 1979 roku, na świecie notowano jedynie pojedyncze przypadki tego typu infekcji.

1. Włodarczyk-Szydłowska Anna, **Florek Magdalena**. Naturalny poziom przeciwciał swoistych przeciw wybranym potencjalnym patogenom w stadninie koni pełnej krwi. W: Problemy zdrowia narządu oddechowego młodych zwierząt gospodarskich: rozpoznawanie i zapobieganie nieinfekcyjnym i infekcyjnym przyczynom zachorowań, 2002, Akademia Rolnicza we Wrocławiu, 139-143.
2. Włodarczyk-Szydłowska Anna, Nowacki Wojciech, **Florek Magdalena**, Staroniewicz Zdzisław. Swoista odporność posiarowa źrebiąt w stadninie koni pełnej krwi. *Medycyna Weterynaryjna*, 2005, 61, 1296-1299.
3. Włodarczyk-Szydłowska Anna, Nowacki Wojciech, **Florek Magdalena**, Staroniewicz Zdzisław. Kształtowanie się u źrebiąt, w okresie od urodzenia do odsadzenia, poziomu swoistych przeciwciał IgM i IgG wobec wybranych bakterii środowiskowych. Włodarczyk-Szydłowska Anna, Nowacki Wojciech, **Florek Magdalena**, Staroniewicz Zdzisław. *Medycyna Weterynaryjna*, 2006, 62, 455-458.
4. Golnik Witold, Pawęska Janusz, Bażanów Barbara, **Florek Magdalena**. Epidemiologia zakażeń wirusem zapalenia tętnic koni (EAV) i wirusem Zachodniego Nilu (WNV). 37, 68 s., 2008, Lubelskie dni wirusologiczne. Program. Streszczenia 2008.
5. Golnik Witold., Bażanów Barbara., **Florek M.**, Pawęska Janusz. Prevalence of equine arteritis and West Nile virus – specific antibodies in thoroughbred horses in Poland. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska*, Pharmacia, sectio DDD, 2008, 21, 1-4.
6. Bażanów Barbara, Jackulak Natalia, **Florek Magdalena**, Staroniewicz Zdzisław. Equid Herpesvirus-Associated Abortion in Poland between 1977-2010. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2012, 32, 747-751.
7. Bażanów Barbara, Pawęska Janusz, Pogorzelska Aleksandra, **Florek Magdalena**, Frącka Agnieszka, Gębarowski Tomasz, Chwirot Wojciech, Stygar Dominika. Serological evidence of common equine viral infections in a semi-isolated, unvaccinated population of Hucul horses. *Animals*, 2021, 11, 1-10: 2261.

Ad. 5

W mikrobiologii klinicznej, podstawą oceny materiału diagnostycznego jest analiza ilościowa i jakościowa wyizolowanej populacji mikroorganizmów, w odniesieniu do fizjologicznej mikrobioty obszaru organizmu, z której pochodziła próbka badana. W związku z powyższym znajomość mikrobioty w warunkach fizjologicznych ma ogromne znaczenie, tym bardziej w mikrobiologii weterynaryjnej, ze względu na różnice dotyczące poszczególnych gospodarzy zwierzęcych. Niezależnie od gatunku gospodarza, błona śluzowa jamy ustnej i gardła jest niszą zasiedloną przez dużą i bardzo zróżnicowaną populację mikroorganizmów. Wiele z nich będąc komensalami, w odpowiednich warunkach może doprowadzić do powstania endogennych infekcji jamy ustnej i gardła, układu oddechowego, czy też ucha. Z kolei prawidłowa mikrobiota jamy ustnej jednego gatunku gospodarza, może stać się przyczyną egzogennej infekcji dla innego gatunku. Przykładem niech będą tu zanieczyszczenia ran

kąsanych, które u człowieka powodowane są przez psy i koty. Poznanie składu gatunkowego mikrobioty błony śluzowej jamy ustnej i gardła zwierząt towarzyszących, a co za tym idzie opracowanie metod identyfikacji szczególnie wymagających w tych kwestiach bakterii, należy do tematów badanych studiowanych w naszym Zakładzie.

Analiza porównawcza mikrobioty tlenowej błony śluzowej gardła psów zdrowych oraz z objawami zapalenia gardła (1, 2) przeprowadzona w ramach naszych badań, pozwoliła wykryć niewielkiego stopnia różnice składu gatunkowego w obu grupach badanych oraz określić oporność bakterii izolowanych z przypadków infekcji. Zaobserwowano, że identyfikacja izolowanych w doświadczeniu rodzajów *Moraxella*, *Pasteurella* oraz *Streptococcus*, może stanowić problem dla rutynowo stosowanych metod diagnostycznych. W związku z powyższym kolejna praca (3) dotyczyła analizy gramujemnych, oksydazo-dodatnich pałeczek i kokopaleczek izolowanych z błony śluzowej gardła psów. Obserwacja, że rutynowo stosowane w laboratoriach testy API NE20 nie są wystarczające do identyfikacji wielu przedstawicieli omawianej grupy, a także mająca w tym momencie miejsce reklasyfikacja mikroorganizmów z rodziny *Pastereuillaceae*, wymagały podjęcia próby określenia nowych cech fenotypowych o znaczeniu diagnostycznym. Jednak ze względu na małą aktywność biochemiczną bakterii studiowanej grupy, wybranymi metodami fenotypowymi udało się zidentyfikować jedynie 44,1% wyizolowanych szczepów bakteryjnych. Uzyskane wnioski wpłynęły na dalszy kierunek badań, w którym opracowano metodę identyfikacji bakterii z rodziny *Pasteurellaceae*, łączącą zastosowanie metod fenotypowych oraz reakcji PCR z zastosowaniem starterów specyficznych dla wybranych gatunków z omawianej grupy bakterii (4, 5). Zastosowane metody fenotypowe obejmowały test na ureazę, indol, dekarboksylazę ornityny (ODC), a także badanie zdolności wytwarzania kwasu z glukozy, sacharozy, mannozy, maltozy i mannitolu. Po ocenie przydatności różnych genów do identyfikacji poszczególnych gatunków należących do rodziny *Pasteurellaceae*, specyficzne pary starterów skonstruowane zostały na podstawie sekwencji następujących genów: *kmt* (*Pasteurella multocida*), *sodA* (*P. canis*, *P. stomatis*, *P. dagmatis*, *P. pneumotropica* (obecnie *Rodentibacter pneumotropicus*)) oraz 16S rRNA (*Haemophilus* (obecnie *Canicola*) *haemoglobinophilus*).

Niejasności diagnostyczne dotyczące populacji *P. dagmatis* izolowanej od kotów, której szczepy przy próbie analizy sekwencji genu 16S rRNA za pomocą algorytmu BLAST wykazywały wysokie (99,47–99,85%) podobieństwo do sekwencji [*P.*] *pneumotropica* NCTC10827 (GenBank accession no. AF224296), obserwowane w poprzedniej pracy, dały początek kolejnej analizie (6, 7). Przy zastosowaniu badania sekwencji genów 16S rRNA i *rpoB* izolowana od kotów grupa omawianych bakterii została jednoznacznie

przyporządkowana do gatunku *P. dagmatis*. Jednocześnie wykazano, że stosując technikę RFLP genu 16S rRNA z użyciem enzymu restrykcyjnego *TaqI* można zróżnicować populacje *P. dagmatis* izolowane od psów i kotów.

W medycynie człowieka duże znaczenie mają zakażenia będące efektem pogryzień powodowanych przez zwierzęta towarzyszące, a najczęściej związane z bakteriami fizjologicznie zasiedlającymi jamę ustną tych zwierząt. Dlatego, na podstawie dostępnej literatury przeprowadzono analizę tego problemu, z uwzględnieniem wiedzy na temat epidemiologii zakażeń powodowanych przez poszczególne rodzaje/gatunki bakterii występujące u psów i kotów (8).

Do opracowań dotyczących diagnostyki chorób bakteryjnych stworzonych przez Zespół naszego Zakładu, zaliczyć należy także opis przypadku klinicznego związanego z infekcją bakterią, która w ostatnim czasie nabrała dużego znaczenia klinicznego. Zastosowanie metod fenotypowych pozwoliło na identyfikację bakterii z gatunku *Providencia alcalifaciens*, izolowanej z przypadku przedłużającej się biegunki u 4-miesięcznego psa (9). *P. alcalifaciens* nie była gatunkiem epidemiologicznie związanym z występowaniem biegunek u psów i kotów, jakkolwiek dwukrotna izolacja tego mikroorganizmu jako flory dominującej i efektywna celowana antybiotykoterapia, mogą sugerować, iż rzeczywiście bakteria ta stanowiła w opisanym przypadku czynnik infekcyjny.

1. Król Jarosław, **Florek Magdalena**, Staroniewicz Zdzisław, Bażanów Barbara: Ocena porównawcza mikroflory tlenowej gardła u psów zdrowych oraz z objawami pharyngitis. *Medycyna Weterynaryjna*, 2004, 60, 271-273.
2. Król Jarosław, Staroniewicz Zdzisław, **Florek Magdalena** : Mikroflora tlenowa gardła psów zdrowych oraz z objawami pharyngitis. W: Nauka praktyce : XII Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych, 15-17 września 2004 roku, Warszawa. 1, Streszczenia. Kluciński Włodzimierz (red.), 2004, Warszawa, Wydawnictwo SGGW, 130-130.
3. Król Jarosław, **Florek Magdalena**, Staroniewicz Zdzisław. Charakterystyka bakterii Gram-ujemnych izolowanych z błony śluzowej gardła psów. *Medycyna Weterynaryjna*, 2005, 61, 86-89.
4. Król Jarosław, Bania Jacek, **Florek Magdalena**, Pliszcak-Król Aleksandra, Staroniewicz Zdzisław. Polymerase chain reaction-based identification of clinically relevant *Pasteurellaceae* isolated from cats and dogs in Poland. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2011, 23, 532-537.
5. Król Jarosław, **Florek Magdalena**, Staroniewicz Zdzisław. Identyfikacja fenotypowa i genotypowa bakterii z rodziny *Pasteurellaceae* izolowanych od psów i kotów. W: XIV Kongres PTNW: Nauka praktyce. Winiarska-Grabosz Elżbieta (red.), 2012, Wrocław, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, s.623-623.
6. Król Jarosław, Bania Jacek, **Florek Magdalena**, Podkowiak Magdalena, Pliszcak-Król Aleksandra, Staroniewicz Zdzisław. Genetic diversity of *Pasteurella dagmatis* as assessed by analysis of the 16S rRNA and *rpoB* gene sequences. *Current Microbiology*, 2011, 63, 87-93.
7. Król Jarosław, **Florek Magdalena**, Staroniewicz Zdzisław. Zróżnicowanie genetyczne szczepów *Pasteurella dagmatis* izolowanych od różnych gatunków zwierząt – gospodarzy. W:

XIV Kongres PTNW : Nauka praktyce. Winiarska-Grabosz Elżbieta (red.), 2012, Wrocław, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, s.601-601.

8. Król Jarosław, **Florek Magdalena**, Pliszcak-Król Aleksandra, Staroniewicz Zdzisław. Analiza mikrobiologiczna ran u ludzi po pogryzieniach przez psy i koty. *Medycyna Weterynaryjna*, 2006, 62, 498-501.
9. Król Jarosław, Janeczek Maciej, Pliszcak-Król Aleksandra, Janeczek Witold, **Florek Magdalena**. *Providencia alcalifaciens* as the presumptive cause of diarrhoea in dog. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2007, 10, 285-287.

7.2. Prowadzenie i udział w pracach badawczych i grantach naukowych.

- Grant NCN No 2012/07/B/ST5/00885 „Projektowanie polimerów koordynacyjnych nowej generacji z węzłami metalicznymi Cu, Ag i Au oraz wielofunkcyjnymi łącznikami organicznymi”, 2013-2016, **wykonawca**.
- Umowa nr NI. 4211. UK/4/7-W/2014 z Centrum Technologii Inhibitorowych Spółka z o.o., z siedzibą w Poznaniu. „Badania aktywności przeciwrzybiczej inhibitorów proteaz cysteinowych białka jaja kurzego”, 2014-2015, **kierownik projektu**.
- Projekt KNOW nr 1/PB/2016/KNOW „Analiza typów molekularnych szczepów grzybów należących do kompleksu *Cryptococcus neoformans/C. gattii* izolowanych na terenie województwa dolnośląskiego”, 2016-2018, **kierownik projektu**.
- Grant NCN No NN 209068140 „Nowe preparaty paszowe z mikroelementami – ich właściwości użytkowe i ocena fizjologiczna”, 2011-2014, **wykonawca**.
- Projekt badawczy, umowa nr 7/7-W/2006, realizowany ze środków Ministerstwa Gospodarki i Pracy (BMWA) Republiki Federalnej Niemiec oraz firmy BioRépair GmbH (Niemcy). Celem projektu było opracowanie podłoża wybiórczo-różnicującego dla dermatofitów oraz przeprowadzenie odpowiednich testów laboratoryjnych, 2006-2007, **wykonawca**.
- Dolnośląski bon na innowacje „Opracowanie innowacyjnych preparatów leczniczych na bazie ekstraktu z kapusty, jako innowacyjny preparat w leczeniu stanów zapalnych wymion oraz racic krów mlecznych” WOI.NI.4211.UKP8/14-W/2019, Partner-przedsiębiorca Euroimpex Polska, 2019-2020, **wykonawca**.

7.3. Nagrody i wyróżnienia.

7.3.1. Nagrody naukowe:

- 2012 – nagroda zespołowa I stopnia Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu za osiągnięcia naukowe.

- 2012 – dodatek projakościowy za aktywność naukową.
- 2006 – nagroda Komitetu organizacyjnego XII Międzynarodowego Sympozjum Naukowo-Szkoleniowego Sekcji Mikologicznej Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego – I nagroda za prezentację pracy w sesji plakatowej.
- 2006 – Nagroda II stopnia PTNW za rok 2005 za współautorstwo pracy: Włodarczyk-Szydłowska Anna, Nowacki Wojciech, Florek Magdalena, Staroniewicz Zdzisław. Swoista odporność posiarowa źrebiąt w stadninie koni pełnej krwi. *Medycyna Weterynaryjna*, 2005, 61, 1296-1299.

7.3.2. Nagrody dydaktyczne:

- 2023 – nagroda zespołowa Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu za osiągnięcia dydaktyczne.

7.3.3. Nagrody organizacyjne:

- 2012 – podziękowania komitetu organizacyjnego XIV Kongresu PTNW za wkład w przygotowanie Kongresu.

Wrocław, 22 września 2023 r.

.....