

AUTOREFERAT

dr n. wet. Kinga Wieczorek

Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego
Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy
w Puławach

Puławy, 2013 r.

1. Imię i nazwisko: Kinga Anna Wieczorek

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

a) 2007 – stopień naukowy: doktor nauk weterynaryjnych, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach (PIWet-PIB), tytuł rozprawy doktorskiej: *Identyfikacja i różnicowanie termotolerancyjnych izolatów Campylobacter w oparciu o wybrane metody biologii molekularnej*

b) 2003 – dyplom ukończenia studiów podyplomowych w zakresie Administracji i Zarządzania, Wydział Prawa i Administracji, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

c) 2002 – stopień naukowy: magister biologii, specjalność mikrobiologia, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, tytuł pracy magisterskiej: *Typowanie mikrosymbiontów Genista tinctoria (L.) pochodzących z Anglii w oparciu o wybrane cechy fenotypowe i genomowe*

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

a) 12.2008 do chwili obecnej – adiunkt, Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

b) 02.2007 - 12.2008 - główny specjalista badawczo – techniczny, Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

c) **11.2003 – 02.2007** - studia doktoranckie, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

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

Osiągnięcie naukowe pod tytułem:

Występowanie i oporność przeciwdrobnoustrojowa oraz charakterystyka molekularna *Campylobacter*

tworzy jednotematyczny cykl następujących publikacji:

Publikacja przeglądowa:

4.1. Wieczorek, K., I. Kania¹, J. Osek. 2011. Antybiotykooporność *Campylobacter* – aspekty epidemiologiczne i zagrożenie zdrowia publicznego. *Medycyna Weterynaryjna* 67:233-239 (IF – brak, punkty MNiSW – 10)²

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dyskusji nad koncepcją pracy, zebraniu literatury, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu, naniesieniu poprawek zaproponowanych przez współautorów, przygotowaniu manuskryptu do druku. Mój udział procentowy w powstanie tej publikacji szacuję na 80%.

Publikacje oryginalne (5):

4.2. Wieczorek, K., I. Kania, J. Osek. 2013. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. isolated from poultry carcasses in Poland. *Journal of Food Protection* doi:10.4315/0362-028X.JFP-13-035 (IF = 1,937, punkty MNiSW - 30)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy i zaplanowaniu wszystkich doświadczeń. Przeprowadziłam wszystkie analizy statystyczne uzyskanych rezultatów. Dokonałam interpretacji wyników badań, napisałam wstępną wersję manuskryptu, naniiosłam wszystkie poprawki zaproponowane przez współautorów oraz opracowałam pod kątem edytorskim ostateczną wersję maszynopisu jak również, jako autor korespondencyjny, wysłałam publikację do druku. Mój udział procentowy w powstanie tej publikacji szacuję na 80%.

¹ Oświadczenia wszystkich współautorów określające wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w Załączniku 5 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

² IF zgodny z rokiem opublikowania, punkty MNiSW zgodne z Załącznikiem do komunikatu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 20 grudnia 2012 r.

- 4.3. Wieczorek, K., R. Szewczyk, J. Osek.** 2012. Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolated from retail raw meat in Poland. *Veterinari Medicina (Veterinary Medicine – Czech)* 57:293-299 (IF = 0,748, punkty MNiSW – 25)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy i zaplanowaniu wszystkich doświadczeń. Napisałam wstępną wersję manuskryptu, naniosałam wszystkie poprawki zaproponowane przez współautorów oraz opracowałam pod kątem edytorskim ostateczną wersję maszynopisu. Mój udział procentowy w powstanie tej publikacji szacuję na 70%.

- 4.4. Wieczorek, K.** 2011. Resistance to quinolones and tetracycline and its molecular background among *Campylobacter* strain isolated in Poland. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 55:613-618 (IF = 0,321, punkty MNiSW – 20)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy i zaplanowaniu wszystkich doświadczeń. Dokonałam interpretacji uzyskanych wyników, napisałam maszynopis publikacji, opracowałam manuskrypt pod kątem wymagań edytorskich i wysłałam do redakcji. Mój udział procentowy w powstanie tej pracy wynosi 100%.

- 4.5. Wieczorek, K., G. A. Dykes, J. Osek, L. L. Duffy.** 2013. Antimicrobial resistance and genetic characterization of *Campylobacter* spp. from three countries. *Food Control* 34:84-91 (IF = 2,656, punkty MNiSW – 35)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i wykonaniu części doświadczeń. Przeprowadziłam wszystkie analizy statystyczne uzyskanych rezultatów. Dokonałam interpretacji wyników badań. Napisałam wstępną wersję manuskryptu, naniosałam wszystkie poprawki zaproponowane przez współautorów oraz opracowałam pod kątem edytorskim ostateczną wersję maszynopisu jak również, jako autor korespondencyjny, wysłałam publikację do druku. Mój udział procentowy w powstanie tej publikacji szacuję na 80%.

- 4.6. Wieczorek, K., E. Denis, O. Lynch, J. Osek.** 2013. Molecular characterization and antibiotic resistance profiling of *Campylobacter* isolated from cattle in Polish slaughterhouses. *Food Microbiology* 34:130-136 (IF = 3,283, punkty MNiSW – 35)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy i zaplanowaniu wszystkich doświadczeń. Wykonałam wszystkie analizy statystyczne uzyskanych wyników oraz dokonałam ich interpretacji. Napisałam wstępną wersję manuskryptu, naniosałam wszystkie poprawki zaproponowane przez współautorów oraz opracowałam pod kątem edytorskim ostateczną wersję maszynopisu jak również, jako autor korespondencyjny, wysłałam publikację do druku. Mój udział procentowy w powstanie tej publikacji szacuję na 80%.

Łączna punktacja 6 prac wchodzących w skład jednotematycznego cyklu publikacji: 155 pkt. (wg listy czasopism punktowanych MNiSW) oraz IF – 8,945

Omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Zachorowania spowodowane przez bakterie należące do rodzaju *Campylobacter*, głównie *C. jejuni* i w mniejszym stopniu *C. coli*, są w ostatnich latach najczęściej występującymi w krajach Unii Europejskiej (UE) chorobami odzwierzęcymi, których źródłem jest zanieczyszczona żywność. W latach 2008 - 2011 obserwowano stały wzrost liczby potwierdzonych laboratoryjnie przypadków kamylobakteriozy u ludzi (5). W 2011 r. według raportu Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) oraz Europejskiego Centrum ds. Zapobiegania i Zwalczania Chorób (ECDC) w krajach UE stwierdzono łącznie 220.209 zachorowań, w tym 354 w Polsce (5). Transmisja *Campylobacter* na ludzi odbywa się zwykle poprzez spożycie zanieczyszczonej tymi drobnoustrojami żywności pochodzenia zwierzęcego, a w szczególności mięsa drobiowego poddanego niewłaściwej obróbce termicznej, niepasteryzowanego mleka czy innych produktów zanieczyszczonych wtórnie tymi bakteriami w trakcie obróbki, transportu lub sprzedaży. Występowanie *Campylobacter* w mięsie drobiowym pozostaje od szeregu lat stale na wysokim poziomie. Obserwowane są jednak znaczące różnice w poziomie zanieczyszczenia tymi drobnoustrojami pomiędzy poszczególnymi krajami członkowskimi UE, wynoszącym wg danych EFSA i ECDC w 2011 r. od 3,2% do 84,6% (5).

Kamylobakterioza u ludzi zwykle nie wymaga ukierunkowanego leczenia i ustępuje samoistnie po kilku dniach. Jednak w poważniejszych przypadkach, np. u pacjentów z osłabionym układem immunologicznym, konieczna jest antybiotykoterapia. Zwykle podaje się makrolidy (w przypadku potwierdzenia laboratoryjnego, że czynnikiem chorobotwórczym jest *Campylobacter*) lub fluorochinolony (przy zatruciach o niepewnej etiologii na tle *Campylobacter* lub w przypadku wyizolowania od pacjenta szczepów opornych na makrolidy). W leczeniu wykorzystuje się też tetracykliny i gentamycynę, ale rzadziej niż wymienione wcześniej czynniki przeciwbakteryjne.

Oporność na substancje przeciwdrobnoustrojowe wśród bakterii zoonotycznych, do których należy *Campylobacter*, jest obecnie przedmiotem szczególnie intensywnych badań, dotyczących całego łańcucha żywnościowego, z uwagi na znaczenie tego zjawiska dla zdrowia publicznego. Wzrastające występowanie szczepów opornych na czynniki przeciwbakteryjne może w znaczący

sposób wpłynąć na efektywność terapii u ludzi. W 2011 r. stwierdzono w krajach UE bardzo wysoki odsetek szczepów *Campylobacter* opornych na fluorochinolony oraz jednocześnie niski lub średni poziom ich oporności na makrolidy, zwłaszcza izolatów pochodzących od ludzi i zwierząt gospodarskich, w tym brojlerów (4). Tego typu dane są szczególnie niepokojące w aspekcie przytoczonych wyżej informacji, że głównym źródłem *Campylobacter* dla ludzi jest mięso drobiowe.

Biorąc powyższe pod uwagę konieczne jest monitorowanie oporności przeciwdrobnoustrojowej bakterii należących do rodzaju *Campylobacter*, a w szczególności *C. jejuni* i *C. coli*, gdyż te dwa gatunki są w 99% przypadków przyczyną zachorowań ludzi. Ważna jest również identyfikacja rodzaju żywności będącej najczęstszym źródłem *Campylobacter* opornych na antybiotyki i posiadających geny umożliwiające ekspresję tej oporności oraz przekazywanie jej do innych drobnoustrojów jak również markerów odpowiedzialnych za wywoływanie kamylobakteriozy u ludzi.

Uwzględniając wzrastający odsetek szczepów izolowanych od zwierząt, z żywności i od ludzi, wykazujących oporność na najważniejsze grupy antybiotyków, oraz nabywanie tej oporności przez bakterie należące do rodzaju *Campylobacter*, szczególnie na fluorochinolony, należy stwierdzić, że problem ten będzie w najbliższej przyszłości narastał. Może to doprowadzić m.in. do utraty terapeutycznego działania fluorochinolonów w leczeniu kamylobakteriozy u ludzi. Makrolidy pozostają obecnie najbardziej efektywne w leczeniu tej choroby, ale wzrastająca i w tym przypadku oporność narzuca konieczność bardzo rozważnego stosowania tych, jak również innych substancji przeciwbakteryjnych, w medycynie ludzkiej i weterynaryjnej.

Szczegółowe omówienie sytuacji epidemiologicznej oraz mechanizmów oporności *Campylobacter* na substancje przeciwdrobnoustrojowe przedstawiono w pracy przeglądowej, wchodzącej w skład jednotematycznego cyklu publikacji: *Wieczorek, K., I. Kania, J. Osek. 2011. Antybiotykooporność Campylobacter – aspekty epidemiologiczne i zagrożenie zdrowia publicznego. Medycyna Weterynaryjna 67:233-239 (poz. 4.1.)*.

Omawiane badania własne, dotyczące występowania i oporności przeciwdrobnoustrojowej oraz charakterystyki molekularnej *Campylobacter* spp., koncentrowały się na kilku celach. Jednym z nich było określenie występowania

oporności wśród *Campylobacter* pochodzących od zwierząt (bydło, drób) i z żywności (mięso drobiowe, wołowina, wieprzowina) na najważniejsze z punktu widzenia medycyny ludzkiej grupy substancji przeciwbakteryjnych. Wybrane do badań czynniki przeciwbakteryjne należały do pięciu różnych klas, a sześć z dziewięciu z nich zaliczonych zostało przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) do kategorii I (krytycznie ważne) dla zdrowia ludzi.

W celu uzyskania porównywalnych wyników we wszystkich, omówionych niżej pracach, do oznaczania oporności przeciwdrobnoustrojowej *Campylobacter* spp. zastosowano jednolitą metodykę opartą o technikę minimalnych rozcieńczeń (Microbroth Dilution Method) i określania wartości MIC (Minimal Inhibitory Concentration). Dla wszystkich badanych izolatów przyjęto jednakowe wartości graniczne (cut off), oparte o kryteria zalecane przez Laboratorium Referencyjne Unii Europejskiej ds. Antybiotykooporności. Dodatkowo, badano także molekularne podstawy oporności na fluorochinolony, tetracykliny oraz erytromycynę, wykorzystując do tego celu testy MAMA-PCR (Mismatch Amplification Mutation Assay – PCR), PCR oraz sekwencjonowanie (6, 12, 13).

Istotnym elementem prowadzonych badań była także identyfikacja genotypowych markerów chorobotwórczości wśród wyosobnionych izolatów *Campylobacter*. Mechanizmy chorobotwórczości *Campylobacter* nie zostały w obecnej chwili wyjaśnione w dostateczny sposób. Oznaczono jednak szereg genów chorobotwórczości, których produkty ekspresji biorą udział w poszczególnych etapach zakażenia, zwłaszcza warunkujące ruchliwość, adhezję drobnoustrojów do komórek nabłonka jelitowego czy produkcję toksyn (1, 3, 7, 9). Łącznie, w zależności od publikacji wchodzących w skład omawianego osiągnięcia naukowego, określano występowanie od 7 do 11 genów włączonych w różne etapy patogenezы kampylobakteriozy. Należały do nich: *flaA* i *flhA* (warunkujące ruchliwość bakterii), *cadF* i *docA* (odpowiedzialne za adhezję do komórek nabłonka jelitowego), *racR* (biorące udział w adhezji i kolonizacji enterocytów), *ceuE* (odgrywające rolę w adhezji i inwazji komórek nabłonka jelitowego), *sodB*, *ciaB*, *iam*, *wlaN* i *virB11* (mających wpływ na inwazję i przeżycie w komórkach gospodarza), *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* oraz klaster genów *cdt* (determinujący produkcję toksyn).

W omawianych badaniach podjęto także próbę określenia wzajemnego pokrewieństwa molekularnego szczepów *Campylobacter* izolowanych w różnym czasie i z różnych źródeł. W tym celu zastosowano kilka technik typowania

genomowego, z których najważniejszą była elektroforeza pulsacyjna w zmiennym polu elektrycznym (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE). Ponadto, wykorzystano także analizę restrykcyjną genu *flaA* (Restriction Fragment Length Polymorphism of the *flaA* gene, *flaA*-RFLP), typowanie w oparciu o sekwencjonowanie zmiennego fragmentu genu *flaA* (the sequence of a short variable region in the gene encoding flagellin A, *flaA*-SVR) oraz typowanie bazujące na oznaczaniu występowania techniką PCR 18 genów ważnych w epidemiologii *Campylobacter* (PCR-Binary Typing scheme, P-BIT) (2, 8, 10, 11).

Jak wspomniano wyżej, spożycie zanieczyszczonego bakteriami *Campylobacter* mięsa drobiowego jest główną przyczyną zachorowania ludzi wywołaną przez te drobnoustroje. Dlatego też prace badawcze, związane z występowaniem szczepów opornych na substancje przeciwdrobnoustrojowe, skoncentrowano na drobiu i produktach drobiowych. Głównym celem badań, których wyniki przedstawiono w publikacji **4.2.** (*Wieczorek, K., I. Kania, J. Osek. 2013. Prevalence and antimicrobial resistance of Campylobacter spp. isolated from poultry carcasses in Poland. Journal of Food Protection* doi:10.4315/0362-028X.JFP-13-035), było określenie występowania *Campylobacter* spp. w tuszach drobiowych oraz oznaczenie ich profilu oporności przeciwdrobnoustrojowej w powiązaniu z jej molekularnymi mechanizmami. Do badań pobierano wymazy z tuszek drobiowych (n = 802) w rzeźniach zlokalizowanych na terenie całego kraju. Obecność *Campylobacter* stwierdzono w przypadku 498 (62,1%) próbek, z czego 267 izolaty (53,6%) stanowiły szczepy *C. jejuni*, a pozostałe 231 (46,4%) izolatów należało do gatunku *C. coli*. Analiza oporności przeciwdrobnoustrojowej wykazała, że 73,5% i 74,1% *Campylobacter* należących do obu gatunków było opornych na antybiotyki z grupy chinolonów – odpowiednio na kwas nalidiksowy i ciprofloksacyne. Na stosunkowo wysokim poziomie kształtowała się także oporność na tetracykliny (47,4% izolatów, w tym 64,9% *C. coli* i 32,2% *C. jejuni*) i streptomycynę (20,5% szczepów, odpowiednio 34,2% *C. coli* i 8,6% *C. jejuni*). Stwierdzono ponadto, że odpowiednio 3,0% *C. coli* i 0,4% *C. jejuni* charakteryzowała się opornością na erytromycynę. Wyższą oporność *C. coli* w stosunku do *C. jejuni* stwierdzono także w przypadku streptomycyny (odpowiednio 34,2% i 8,6% izolatów) oraz gentamycyny (odpowiednio 0,9% i 0,4% szczepów). Wykazano ponadto, że 16,1% szczepów charakteryzowało się opornością wieloraką, tzn. były niewrażliwe na trzy lub więcej

klasy używanych w pracy antybiotyków. Przeprowadzone badania molekularnych podstaw antybiotykooporności pozwoliły na stwierdzenie, że 99,5% szczepów *Campylobacter* opornych na chinolony posiadało mutacje w genie *gyrA*, powodującą zamianę treoniny w izoleucynę natomiast 99,6% *C. jejuni* i *C. coli* opornych na tetracykliny miało gen *tet(O)*. Wykazano ponadto, że oporność na erytromycynę uwarunkowana była mutacją A2075G w genie 23S *rRNA*.

Uzyskane wyniki są pierwszymi tak kompleksowymi badaniami w Polsce, dotyczącymi szczepów *Campylobacter* wyosobnionych z tusz drobiowych na etapie rzeźni. Wskazują one, że tusze drobiowe mogą być źródłem dla konsumentów szczepów *C. jejuni* i *C. coli* opornych na ważne z punktu widzenia medycyny ludzkiej antybiotyki. Wyniki przeprowadzonych badań sugerują ponadto, że poziom oporności przeciwdrobnoustrojowej był zależny od gatunku *Campylobacter*, zwłaszcza w przypadku tetracyklin, streptomycyny i chinolonów.

Kolejnym etapem prowadzonych badań nad opornością przeciwdrobnoustrojową *Campylobacter* było określenie jej występowania u szczepów izolowanych z surowego mięsa dostępnego w handlu. Wyniki mojej pracy zostały zaprezentowane w publikacji **4.3.** (Wieczorek, K., R. Szewczyk, J. Osek. 2012. *Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of Campylobacter jejuni and C. coli isolated from retail raw meat in Poland. Veterinarni Medicina (Veterinary Medicine – Czech) 57:293-299*). W pierwszej kolejności określałam występowanie *Campylobacter* w różnych elementach tusz drobiowych, a także w mięsie wołowym i wieprzowym, uwzględniając liczbę tych drobnoustrojów. Obecność *Campylobacter* stwierdzono jedynie w mięsie drobiowym a odsetek wyników dodatnich był bardzo wysoki i wynosił 87,2%. Identyfikacja gatunkowa wyosobnionych drobnoustrojów, wykonana techniką PCR, pozwoliła na określenie, że 58,9% wyizolowanych szczepów stanowiły *C. coli* a pozostałe 41,1% *C. jejuni*. W przypadku 20,2% próbek dodatnich oznaczona liczba drobnoustrojów wyniosła powyżej 10^2 jtk/g. U wszystkich otrzymanych izolatów *Campylobacter* określono profil oporności przeciwdrobnoustrojowej i podobnie jak w poprzednich badaniach stwierdzono również wysoki odsetek izolatów opornych na chinolony (odpowiednio 88,1% i 86,8% w odniesieniu do ciprofloksacyny i kwasu nalidiksowego), w przypadku obu gatunków *Campylobacter*. Z drugiej strony zaobserwowano różnice gatunkowe w oporności przeciwdrobnoustrojowej w odniesieniu do tetracyklin i

streptomycyny, na które było opornych odpowiednio 63,3% i 49,2 oraz 31,1% i 10,6% szczepów *C. coli* i *C. jejuni*. Niepokojącym wydaje się być fakt, że 60,9% przebadanych *Campylobacter* było opornych na substancje przeciwbakteryjne należące do dwóch lub więcej klas. Dodatkowo, badania dotyczące występowania wśród izolatów *Campylobacter* wyosobnionych z tusz drobiowych dostępnych w handlu siedmiu genów odpowiedzialnych za różne etapy patogenezы kamylobakteriozy, pozwoliły stwierdzić u wszystkich szczepów obecność markerów *cadF* i *flaA*. Większość badanych drobnoustrojów charakteryzowała się także występowaniem genów odpowiedzialnych za wytwarzanie toksyny cdt - *cdtA*, *cdtB* i *cdtC*. Wysoki odsetek szczepów *C. coli* był również dodatni w kierunku markera *iam* (88,8%), który występował w mniejszym odsetku u *C. jejuni* (53,8%). Najmniej izolatów *Campylobacter*, niezależnie od gatunku, posiadało gen *virB11*. Uzyskane w omawianej publikacji wyniki wskazują jednoznacznie, że mięso drobiowe dostępne w handlu może stanowić potencjalne zagrożenie zdrowia konsumentów ze względu na częstą obecność *Campylobacter*, ich oporność przeciwdrobnoustrojową oraz występowanie u wysokiego odsetka szczepów różnych genów chorobotwórczości.

Celem dalszych badań, których wyniki zaprezentowano w pracy **4.4.** (*Wieczorek, K. 2011. Resistance to quinolones and tetracycline and its molecular background among Campylobacter strain isolated in Poland. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 55:613-618*) było określenie występowania oporności na chinolony i tetracykliny u szczepów *C. jejuni* i *C. coli* izolowanych z jelit i tusz drobiowych, w powiązaniu z identyfikacją molekularnych mechanizmów oporności na te substancje przeciwdrobnoustrojowe. W pracy wykorzystano 107 izolatów *C. jejuni* (55 wyosobnionych z jelit i 52 z tusz) oraz 93 szczepy *C. coli* (45 z jelit i 48 z tusz). Wyniki prowadzonych badań pozwoliły stwierdzić wysoki odsetek szczepów opornych na ciprofloksacynę i kwas nalidiksowy, w obrębie obu oznaczonych w pracy gatunków *Campylobacter*. W przypadku *C. coli* wyniósł on dla obu antybiotyków 82% i 75%, odpowiednio dla szczepów pochodzących z jelit i tusz drobiowych, natomiast w odniesieniu do *C. jejuni* oporność ta kształtowała się na poziomie 79% i 78% dla izolatów wyosobnionych odpowiednio z jelit i tusz. Oporność na tetracykliny, była niższa i wynosiła odpowiednio 56% i 46% dla szczepów *C. coli* oraz 50% i 44% w przypadku *C. jejuni* pochodzących odpowiednio z jelit i tusz drobiowych. W następnym etapie badań określono występowanie mutacji w genie *gyrA*,

odpowiedzialnym za oporność na antybiotyki z grupy chinolonów. W tym celu dokonano optymalizacji testu MAMA-PCR, który pozwolił na identyfikację mutacji DNA w kodonie 86, skutkującej zamianą treoniny w izoleucynę. Wyniki takie stwierdzono odpowiednio u 100% izolatów *C. coli* i 78,6% *C. jejuni* opornych na ciprofloksacynę. Z drugiej strony, żaden szczep wrażliwy na ten antybiotyk nie dawał dodatniego wyniku w analizie MAMA-PCR. Rezultaty te zostały potwierdzone przez sekwencjonowanie odpowiedniego fragmentu genu *gyrA* dla wybranej losowo grupy szczepów. Wszystkie izolaty *Campylobacter* zostały także zbadane pod kątem obecności genu *tet(O)*, odpowiedzialnego za występowanie oporności na tetracykliny. Stwierdzono niemal 100% korelację pomiędzy występowaniem tego markera molekularnego a oznaczoną fenotypowo opornością na tę grupę substancji przeciwbakteryjnych. Omawiane badania pozwoliły na szerszą identyfikację występującej oporności na chinolony i tetracykliny u szczepów *Campylobacter* pochodzących z jelit i tusz drobiowych, z uwzględnieniem jej molekularnych aspektów. Tego typu dane są bardzo istotne w odniesieniu do wzrastającej w ostatnich latach oporności na te substancje przeciwbakteryjne.

Bardzo ważnym elementem prowadzonych przeze mnie badań był projekt, którego wyniki zostały przedstawione w pracy 4.5. (Wieczorek, K., G. A. Dykes, J. Osek, L. L. Duffy. 2013. *Antimicrobial resistance and genetic characterization of Campylobacter spp. from three countries. Food Control 34:84-91*). Jego celem było porównanie oporności przeciwdrobnoustrojowej, obecności genów chorobotwórczości a także zróżnicowania genetycznego szczepów *Campylobacter* izolowanych od drobiu w trzech różnych krajach: Polski, Australii i Malezji. Kraje, z których pochodziły izolaty, są odległe od siebie nie tylko pod względem geograficznym, ale także stosowanych systemów hodowli i możliwości używania antybiotyków u zwierząt. W pierwszym etapie badań określono oporność szczepów *Campylobacter* na 9 czynników przeciwbakteryjnych. Stwierdzono, że szczepy pochodzące z Australii, niezależnie od gatunku *Campylobacter*, charakteryzowały się największą wrażliwością na stosowane w pracy antybiotyki. Na drugim biegunie znalazły się szczepy *C. jejuni* i *C. coli* wyosobnione w Malezji, które były odporne na co najmniej trzy substancje przeciwbakteryjne, a dodatkowo znaczna ich część wykazywała oporność na 8 z 9 używanych w badaniach antybiotyków. Szczepy pochodzące z Polski cechowały się natomiast średnim poziomem oporności i były

najczęściej niewrażliwe na ciprofloksacynę, kwas nalidiksowy i tetracykliny, co było zgodne z wcześniej prowadzonymi przeze mnie badaniami. Występowanie genów chorobotwórczości także różniło się znacząco pomiędzy izolatami *Campylobacter* wyosobnionymi w tych krajach, zwłaszcza w odniesieniu do genów *ciaB* i klastru *cdt*. W kolejnym etapie badań wykonano typowanie molekularne izolatów *Campylobacter*. W celu zwiększenia wiarygodności wyników i uzyskania rzeczywistego obrazu pokrewieństwa filogenetycznego badanych szczepów zastosowano trzy techniki molekularne o różnym potencjale różnicującym: P-BIT, *flaA*-SVR oraz *flaA*-RFLP, otrzymując odpowiednio 50, 30 i 11 różnych profili genotypowych. Uzyskane wyniki pokazują jednoznacznie duże zróżnicowanie populacji *Campylobacter* w badanych krajach jak też między poszczególnymi krajami. Rezultaty pracy mogą wskazywać na zależność między stosowaniem profilaktycznym lub leczniczym substancji przeciwbakteryjnych w poszczególnych krajach, z których pochodziły izolaty *Campylobacter* a występowaniem oporności u szczepów wyosobnionych z żywności. Unikalność prowadzonych analiz polegała również na zastosowaniu jednolitej metodyki, a w szczególności wartości granicznych przy klasyfikacji wrażliwości przeciwdrobnoustrojowej szczepów *Campylobacter*, co umożliwiło na wiarygodne porównanie oporności izolatów pochodzących z krajów zlokalizowanych na trzech różnych kontynentach.

Badania, których wyniki zostały zaprezentowane w pracy 4.6. (Wieczorek, K., E. Denis, O. Lynch, J. Osek. 2013. *Molecular characterization and antibiotic resistance profiling of Campylobacter isolated from cattle in Polish slaughterhouses. Food Microbiology 34:130-136*) miały na celu wykazanie czy bydło może stanowić źródło potencjalnie niebezpiecznych dla człowieka *Campylobacter*. W związku z tym pobierano bezpośrednio na linii ubojowej wymazy ze skóry bydła i odpowiadającej im tuszy i stwierdzono, że odpowiednio 25,6% i 2,7% próbek było dodatnich w kierunku *Campylobacter*. Większość otrzymanych izolatów stanowiły *C. jejuni*, niezależnie od miejsca izolacji. Szczepy *Campylobacter* pozyskane ze skór i tusz wołowych poddano następnie kompleksowej analizie, polegającej na oznaczeniu ich profili markerów chorobotwórczości oraz oporności przeciwdrobnoustrojowej. Dodatkowo, izolaty typowano molekularnie przy użyciu techniki PFGE. Podsumowując uzyskane wyniki stwierdzono, że występowały różnice statystycznie istotne pomiędzy obecnością 8 z 11 badanych genów chorobotwórczości u *C. jejuni* i *C. coli*.

Większość szczepów *Campylobacter*, niezależnie od gatunku posiadała jednak geny *cadF*, *flhA* i *flaA*, odpowiedzialne za ruchliwość i adhezję drobnoustrojów do komórek nabłonka jelitowego gospodarza. Analiza oporności przeciwdrobnoustrojowej pozwoliła natomiast stwierdzić, że najwięcej szczepów było opornych na kwas nalidiksowy i ciprofloksacynę (po 38,3% izolatów) oraz streptomycynę (24,3% szczepów) i tetracykliny (20,9%). Wielooporność, definiowaną jako oporność na co najmniej trzy klasy antybiotyków, zidentyfikowano u 13,2% *C. jejuni* i aż u 44,7% *C. coli*. Ponadto stwierdzono, że badana grupa szczepów charakteryzowała się dużym zróżnicowaniem molekularnym, gdyż wyodrębniono wśród nich aż 74 profile PFGE, 16 profili genów chorobotwórczości oraz 12 grup oporności na substancje przeciwdrobnoustrojowe. Zaobserwowano także słabą korelację pomiędzy otrzymanymi profilami, tzn. szczepy *Campylobacter*, należące do tych samych grup w analizie PFGE, w zdecydowanej większości posiadały inny profil genów wirulencji czy oporności przeciwdrobnoustrojowej. Ponadto, jedynie w czterech przypadkach uzyskano ten sam obraz PFGE u szczepów pozyskanych ze skóry i odpowiadającej im tuszy wołowej, co może wskazywać na krzyżowe zanieczyszczeniu tusz podczas uboju. Podsumowując uzyskane wyniki stwierdzono, że bydło może stanowić niedoszacowane źródło potencjalnie patogennych dla ludzi *Campylobacter*, cechujących się wysokim poziomem oporności przeciwdrobnoustrojowej oraz obecnością genów chorobotwórczości.

Na podstawie uzyskanych wyników badań, zawartych w publikacjach składających się na prezentowane osiągnięcie naukowe, można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Drób i mięso drobiowe jak również bydło i tusze wołowe mogą być źródłem potencjalnie chorobotwórczych dla ludzi i opornych na substancje przeciwdrobnoustrojowe *Campylobacter*. Bardzo niepokojący wydaje się być fakt stwierdzenia wysokiego odsetka szczepów opornych na erytromycynę, zwłaszcza w odniesieniu do *C. coli* izolowanych z tusz wołowych.
2. Szereg *Campylobacter* pochodzących od zwierząt rzeźnych i z żywności charakteryzowała się opornością na więcej niż jeden z badanych czynników przeciwbakteryjnych, zwłaszcza na kwas nalidiksowy, ciprofloksacynę oraz tetracykliny, niezależnie od gatunku i źródła szczepów *Campylobacter*.

3. W zdecydowanej większości przypadków szczepy *C. coli* wykazywały wyższy poziom oporności na substancje przeciwbakteryjne oraz wielooporność w porównaniu z izolatami *C. jejuni*.
4. Mutacją warunkującą oporność na chinoliny, była w zdecydowanej większości przypadków zmiana w kodonie 86, skutkująca substytucją treoniny na izoleucynę. Oporność na erytromycynę związana była z mutacją A2075G w genie 23S *rRNA*, natomiast oporność na tetracykliny warunkowana była obecnością genu *tet(O)*.
5. Większość badanych szczepów posiadała przynajmniej kilka genów chorobotwórczości, co wskazuje na ich znaczny potencjał do wywołania kamylobakteriozy u ludzi.
6. Prowadzone badania były pierwszymi tak kompleksowymi analizami dotyczącymi występowania oporności przeciwdrobnoustrojowej u izolatów *Campylobacter* pochodzących z różnych źródeł, a w szczególności pobieranych na etapie rzeźni. Uzyskane wyniki wskazują na konieczność podjęcia działań w zakresie ograniczenia zanieczyszczenia tusz podczas uboju oraz prowadzenia stałego monitoringu sytuacji epidemiologicznej w tym zakresie.

Piśmiennictwo:

1. Bang D.D., Nielsen E.M., Scheutz F., Pedersen K., Handberg K., Madsen M. (2003). PCR detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from Danish pigs and cattle and cytolethal distending toxin production of the isolates. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 1003-1014.
2. Cornelius A. J., Gilpin B., Carter P., Nicol C., On S. L. (2010). Comparison of PCR binary typing (P-BIT), a new approach to epidemiological subtyping of *Campylobacter jejuni*, with serotyping, pulsed-field gel electrophoresis, and multilocus sequence typing methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 1533-1544.
3. Datta S., Niwa H., Itoh K. (2003). Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. *Journal of Medical Microbiology*, 52, 345-348.
4. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). (2013). The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. *EFSA Journal*, 3196, 359 pp.
5. EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) (2013). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal*, 3129, 250 pp.
6. Gibreel A., Tracz D.M., Nonaka L., Ngo T.M., Connell S.R., Taylor D.E. (2004). Incidence of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* isolated in Alberta, Canada, from 1999 to 2002, with special reference to tet(O)-mediated tetracycline resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 3442-3450.

7. Müller J., Schulze F., Müller W., Hänel I. (2006). PCR detection of virulence associated genes in *Campylobacter jejuni* strains with differential ability to invade Caco-2 cells and to colonize the chick gut. *Veterinary Microbiology*, 113, 123-129.
8. Nachamkin I., Bohachick K., Patton C.M. (1993). Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 1531-1536.
9. Rapabelli G., Tamburro M., Minelli F., Leone A., Sammarco M.L. (2010). Prevalence of virulence-associated genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter* spp. isolated in Italy. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 33, 355–364.
10. Ribot E.M., Fitzgerald C., Kubota K., Swaminathan B., Barrett T.J. (2001). Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 1889-1894.
11. Wassenaar T.M., Fernández-Astorga A., Alonso R., Marteinsson V.T., Magnússon S.H., Kristoffersen A.B., Hofshagen M. (2009). Comparison of *Campylobacter* fla-SVR genotypes isolated from humans and poultry in three European regions. *Letters in Applied Microbiology*, 49, 388-395.
12. Zirnstein G., Hesel L., Li Y., Swaminathan B., Besser J. (2000). Characterization of *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Campylobacter coli* by DNA sequence analysis and MAMA PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 190, 1-7.
13. Zirnstein G., Li Y., Swaminathan B., Angulo F. (1999). Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* isolates: detection of *gyrA* resistance mutations by mismatch amplification mutation assay PCR and DNA sequence analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 3276-3280.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

5.1. Osiągnięcia naukowe przed uzyskaniem stopnia doktora:

Zainteresowania badawcze:

- 5.1.1. Badania nad shigatoksynami *Escherichia coli*, w tym nowe metody wykrywania tych drobnoustrojów techniką multipleks PCR z wewnętrzną kontrolą amplifikacji oraz identyfikacja markerów patogenności
- 5.1.2. Opracowanie i zastosowanie testów multipleks PCR do równoczesnej identyfikacji *Campylobacter jejuni* i *C. coli*
- 5.1.3. Różnicowanie termotolerancyjnych *Campylobacter* przy zastosowaniu technik biologii molekularnej

W ciągu 3,5 lat studiów doktoranckich w PIWet – PIB w Puławach miałam możliwość odbycia szeregu szkoleń, głównie z zakresu biologii molekularnej oraz wykrywania i różnicowania *Campylobacter* spp., co było związane z moimi zainteresowaniami badawczymi. Pozyskaną w ten sposób wiedzę oraz umiejętności wykorzystałam do prowadzenia badań naukowych z tego zakresu, jak również

dotyczących identyfikacji i charakterystyki chorobotwórczych dla zwierząt i ludzi szczepów *Escherichia coli*. W tym czasie uczestniczyłam w dwóch projektach badawczych, w tym byłam głównym wykonawcą grantu promotorskiego. Wymiernym efektem prowadzonych przez mnie badań były publikacje naukowe, z których najważniejsze przedstawiłam poniżej. Studia zakończyłam obroną pracy doktorskiej, która odbyła się 21 lutego 2007 r. w PIWet – PIB w Puławach.

Ważniejsze publikacje będące efektem omówionych badań³:

1. Wieczorek, K., A. Kowalczyk, J. Osek. 2004. Relationship between phenotype and genotype of *Escherichia coli* O149:K91, F4 strains isolated from pigs with diarrhoea. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 48:219-223
2. Wieczorek, K., J. Osek. 2004. Development of a PCR internal amplification control for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 48:379-401
3. Tatarczak, M., K. Wieczorek, B. Posse, J. Osek. 2005. Identification of putative adhesin genes in shigatoxigenic *Escherichia coli* isolated from different sources. Veterinary Microbiology 110:77-85
4. Wieczorek, K., J. Osek. 2005. Testy multiplex PCR do równoczesnej identyfikacji *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli*. Medycyna Weterynaryjna 61:797-799
5. Osek, J., A. Kowalczyk, K. Wieczorek. 2005. Molekularne metody wykrywania i identyfikacji chorobotwórczych bakterii w żywności. Medycyna Weterynaryjna 61:5-9
6. Wieczorek, K., J. Osek. 2005. *Campylobacter* – przyczyną zakażeń pokarmowych. Medycyna Weterynaryjna 61:847-851
7. Wieczorek, K., Osek, J. 2005. Przydatność wybranych technik PCR w różnicowaniu termotolerancyjnych szczepów *Campylobacter*. Żywność - Nauka Technologia Jakość 45:132-138
8. Wieczorek, K., J. Osek. 2008. Typowanie molekularne szczepów *Campylobacter* przy użyciu technik opartych o reakcję łańcuchową polimerazy. Acta Scientiarum Polonorum Medicina Veterinaria 7:29-39
9. Wieczorek, K., J. Osek. 2008. Identification of virulence genes in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolates by PCR. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 52:211-216
10. Wieczorek, K., J. Osek. 2008. Comparison of two molecular methods for genotyping of *Campylobacter* sp. isolated from poultry. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 52:523-528

³ Wykaz wszystkich opublikowanych prac naukowych zamieszczono Załączniku 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

11. Wieczorek, K. 2009. Relationship between the molecular typing of *Campylobacter* strains and the prevalence of their virulence genes. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 53:193-198
12. Wieczorek, K., J. Osek. 2011. Molecular characterization of *Campylobacter* spp. isolated from poultry faeces and carcasses in Poland. Acta Veterinaria Brno 80:19-27

5. 2. Osiągnięcia naukowe po uzyskaniu stopnia doktora

Zainteresowania badawcze:

5.2.1. Wstępowanie najważniejszych patogenów w żywności pochodzenia zwierzęcego

Bakterie chorobotwórcze takie jak *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. *Listeria monocytogenes* czy werotoksyczne (shigatoksyczne) *E. coli* (verotoxigenic *E. coli*, VTEC; STEC) są obecnie jednymi z najczęstszych przyczyn zatruc pokarmowych ludzi spowodowanych spożyciem zanieczyszczonej żywności. Celem prowadzonych przez mnie w latach 2007-2012 badań było m.in. określenie występowania bakterii zoonotycznych u bydła, w tuszach wołowych i mięsie wołowym w Polsce. Projekt był finansowany w ramach grantu 6 programu ramowego UE: *ProSafeBeef: Improving the quality and safety of beef products for the consumer in production and processing*. Materiał do badań stanowiło 406 wymazów ze skóry bydła i 406 wymazów z odpowiadających im tusz wołowych uzyskiwanych bezpośrednio na linii ubojowej. Dodatkowo przebadano 417 próbek mięsa wołowego zakupionego w lokalnych sklepach. Próbki badano w kierunku obecności *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. oraz *L. monocytogenes* przy zastosowaniu metod znormalizowanych ISO, komercyjnych testów biochemicznych oraz metod opartych na PCR, pozwalających na identyfikację gatunkową *Campylobacter* spp. Ostatnią z wymienionych technik użyto także do wykrywania obecności VTEC, co pozwoliło na identyfikację innych niż O157 grup serologicznych, które można wykrywać metodą znormalizowaną PN-EN ISO 16654:2002. W metodyce bazującej na amplifikacji DNA, składającej się z dwóch etapów, pierwotną hodowlę bakteryjną wykorzystywano jako źródło matrycowego DNA do przeprowadzenia reakcji PCR. W przypadku otrzymania wyniku dodatniego, hodowlę taką wysiewano na agar odżywczy, z którego izolowano zróżnicowane morfologiczne kolonie, badane

następnie w drugiej reakcji PCR w celu potwierdzenia przynależności izolatów bakteryjnych do grupy VTEC.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że skóry i tusze wołowe były zanieczyszczone w największym stopniu przez werotoksyczne *E. coli*. Na podstawie wyników pierwszej reakcji PCR w kierunku obecności genu *stx*, kodującego toksynę Shiga, 117 (28,8%) próbek ze skóry i 62 (15,3%) z tusz wołowych wykazywało obecność VTEC. W drugim etapie badań izolaty bakteryjne potwierdzone jako VTEC, udało się wyosobnić jedynie z 32 i 24 próbek pochodzących odpowiednio ze skóry i tusz wołowych. W przypadku próbek mięsa dostępnego w handlu najwięcej wyników dodatnich uzyskano w odniesieniu do *L. monocytogenes* (92 z 411 badanych próbek, 21,8%). Obecność bakterii z rodzaju *Campylobacter* stwierdzono najczęściej w wymazach ze skór wołowych (25,6% wyników dodatnich). Z drugiej strony, badane próbki, niezależnie od ich rodzaju, były najrzadziej zanieczyszczone *Salmonella* spp., które występowały zwykle w mięsie wołowym (2,2% wyników dodatnich). Efektem uzyskanych wyników było także określenie zanieczyszczenia próbek więcej niż jednym z badanych drobnoustrojów w tym samym czasie. Stwierdzono, że próbki ze skóry bydła wykazywały najczęściej równoczesną obecność *Campylobacter* spp. i VTEC, tusze wołowe - *Campylobacter* spp. i VTEC oraz *L. monocytogenes* i VTEC, a mięso wołowe - *L. monocytogenes* i *Salmonella* spp. Poddano także ocenie czynniki mogące wpływać na częstotliwość występowania w badanych próbkach bakterii chorobotwórczych, takie jak wiek bydła czy czas w jakim były pobierane próbki. Stwierdzono, że najbardziej zanieczyszczone były tusze pochodzące od najstarszych zwierząt, powyżej 6 roku życia. Zwiększoną częstotliwość występowania badanych drobnoustrojów, w zależności od pory roku, zaobserwowano w miesiącach jesiennych, w przypadku oznaczania *L. monocytogenes* i VTEC, obecnych w tuszach bydłowych.

Uzyskane wyniki wskazują, że skóra, tusze i mięso wołowe mogą być zanieczyszczone drobnoustrojami chorobotwórczymi dla człowieka, zwłaszcza VTEC, *Campylobacter* spp. i *L. monocytogenes* a w mniejszym stopniu *Salmonella* spp.

Ważniejsze publikacje będące efektem omówionych badań:

1. Wieczorek, K., E. Denis, J. Osek. 2009. Occurrence of four major food-borne pathogens in cattle slaughtered in Poland. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 53:439-444

2. Wieczorek, K., J. Osek. 2010. Simultaneous occurrence of selected food-borne bacterial pathogens on bovine hides, carcasses and beef meat. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 13:645-651
3. Wieczorek, K., E. Denis, J. Osek. 2010. Występowanie bakterii chorobotwórczych w tuszach wołowych i związane z tym zagrożenie zdrowia konsumentów. *Medycyna Weterynaryjna* 66:54-58

5.2.2. Oznaczanie i analiza oporności na substancje przeciwdrobnoustrojowe *Listeria monocytogenes*, werotoksycznych *Escherichia coli* (VTEC) i *Salmonella* spp.

Istotnym elementem moich zainteresowań badawczych była analiza występowania oporności na substancje przeciwdrobnoustrojowe bakterii chorobotwórczych izolowanych z żywności pochodzenia zwierzęcego. Badania te koncentrowały się na szczepach należących do rodzaju *Campylobacter*, co zostało szczegółowo opisane w Punkcie 4 (str. 3). Oprócz tych drobnoustrojów, oznaczano także antybiotykooporność innych bakterii zoonotycznych, a zwłaszcza *L. monocytogenes*, VTEC i *Salmonella* spp. Szczepy wyizolowane w ramach wspomnianego wyżej projektu *ProSafeBeef: Improving the quality and safety of beef products for the consumer in production and processing* poddano badaniom obejmującym m.in. identyfikację oporności na wybrane substancje przeciwdrobnoustrojowe. Określono wrażliwość szczepów *L. monocytogenes* (n = 44) na 16 substancji przeciwbakteryjnych i stwierdzono, że najwięcej z nich było opornych na oksacylinę (72,2% izolatów) i klindamycynę (37,0% szczepów). Wykazano również, że w badanej grupie izolatów 46,7% opornych było na dwie substancje przeciwbakteryjne jednocześnie. Werotoksyczne *E. coli* (VTEC) analizowano natomiast pod kątem oporności na 9 substancji przeciwbakteryjnych i stwierdzono jedynie oporność na sulfametoksazol u 38 z 61 (62,3%) badanych izolatów. Oporność na tę substancję przeciwbakteryjną była również najczęściej stwierdzana u szczepów rodzaju *Salmonella*, którą oznaczono u 33,3% badanych próbek. U pojedynczych szczepów obserwowano także oporność na streptomycynę, tetracykliny i ampicylinę. Niepokojącym wydaje się być fakt izolacji szczepu opornego równocześnie na cztery badane substancje przeciwbakteryjne.

Oporność na czynniki przeciwdrobnoustrojowe wśród bakterii zoonotycznych, do których należą *L. monocytogenes*, VTEC i *Salmonella* spp. jest obecnie przedmiotem szczególnie intensywnych badań, zwłaszcza dotyczących

drobnoustrojów wyosobnionych od zwierząt i z żywności, z uwagi na znaczenie tego zjawiska dla zdrowia publicznego. Wzrastające występowanie szczepów opornych na substancje przeciwdrobnoustrojowe może w znaczący sposób wpłynąć na efektywność terapii u ludzi. Z tych też względów, podjęcie tego typu badań w ramach własnych zainteresowań naukowych, było niezwykle ważne z punktu widzenia zapewnienia bezpiecznej dla konsumentów żywności pochodzenia zwierzęcego.

Ważniejsze publikacje będące efektem omówionych badań:

1. Wieczorek, K., K. Dmowska, J. Osek. 2012. Prevalence, characterization, and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from bovine hides and carcasses. *Applied and Environmental Microbiology* 78:2043-2045
2. Wieczorek, K., K. Dmowska, J. Osek. 2012. Characterization and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from retail beef meat in Poland. *Foodborne Pathogens and Disease* 9:681-685

5.2.3. Charakterystyka molekularna szczepów *Listeria monocytogenes*, werotoksycznych *Escherichia coli* (VTEC) i *Salmonella* spp.

W swojej pracy naukowej wykorzystuję powszechnie techniki biologii molekularnej. Przykładem ich zastosowania mogą być badania dotyczące występowania markerów chorobotwórczości szczepów *L. monocytogenes* oraz VTEC izolowanych z żywności pochodzenia zwierzęcego. W przypadku *L. monocytogenes*, opierając się na technice PCR, oznaczano występowanie pięciu takich genów, natomiast u szczepów VTEC było to osiem markerów. Na podstawie serotypowania molekularnego techniką PCR stwierdzono, że większość szczepów *L. monocytogenes* należała do grupy 1/2a, najczęściej izolowanej z przypadków listeriozy u ludzi. O potencjale chorobotwórczym tych izolatów świadczył fakt, że posiadały one co najmniej cztery z oznaczanych pięciu genów patogenności, tzn. *inlA*, *inlC*, *inlJ*, odpowiedzialnych za wytwarzanie białka podobnego internaliny oraz *Imo2672*, warunkującego ekspresję regulatora transkryptazy. W przypadku szczepów VTEC u większości z nich zidentyfikowano gen *stx2*, kodujący podstawową odmianę toksyny Shiga (Vero) – Stx2, będącą jednym z najważniejszych czynników chorobotwórczości tych izolatów.

Innym przykładem zastosowania w moich badaniach technik molekularnych były prowadzone analizy pokrewieństwa molekularnego szczepów *L. monocytogenes*,

VTEC oraz *Salmonella* spp. za pomocą techniki PFGE. Typowaniu przy użyciu endonukleazy *Ascl* poddano 135 szczepów *L. monocytogenes*, wyisobnionych od bydła rzeźnego i mięsa wołowego. Do analizy otrzymanych profili PFGE zastosowano oprogramowanie Bionumerics® a pokrewieństwo genotypowe izolatów oznaczano stosując algorytm analizy par skojarzonych UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages), ze współczynnikiem Dice i 2% tolerancją różnicy położenia porównywanych fragmentów restrykcyjnych DNA. Na tej podstawie wyodrębniono 69 różnych profili PFGE (z 95% podobieństwem), z których 19 było wspólnych dla dwóch lub więcej szczepów *L. monocytogenes*. Podobne badania przeprowadzono z wykorzystaniem szczepów VTEC (n = 61), których DNA poddano trawieniu enzymem *XbaI*. W ich wyniku uzyskano 37 profili restrykcyjnych, z których 14 było wspólnych dla dwóch lub więcej izolatów. Ten sam enzym zastosowano także do analizy restrykcyjnej 18 szczepów *Salmonella* spp. wyizolowanych z tych samych próbek i uzyskano dziewięć odmiennych profili, z których cztery były wspólne dla co najmniej dwóch izolatów.

Podsumowując omówione wyżej wyniki badań można stwierdzić, że analizowane szczepy stanowiły zróżnicowane grupy, w których nie zaobserwowano dominującego profilu restrykcyjnego. Niemniej jednak, w kilku przypadkach zidentyfikowano profil wspólny dla szczepów izolowanych ze skóry i tuszy wołowej, co mogło wskazywać na możliwe zanieczyszczenie krzyżowe tusz drobnoustrojami pochodzącymi ze skóry tego samego zwierzęcia, jakie mogło mieć miejsce podczas uboju.

Ważniejsze publikacje będące efektem omówionych badań:

1. Wieczorek, K., I. Kania, J. Osek. 2009. Identification of main virulence markers of food-borne pathogens recovered from bovine carcasses as an aid in assessing public health risk. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 53:425-432
2. Dmowska, K., K. Wieczorek, O. Lynch, J. Osek. 2013. Typing of *Listeria monocytogenes* isolated from slaughtered cattle and beef meat. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 57:179-183

5.2.4. Określenie występowania nowych serotypów werotoksycznych *Escherichia coli* (VTEC) w wołowinie i produktach wołowych

Werotoksyczne *E. coli* (VTEC) mogą powodować poważne zachorowania u ludzi, objawiające się zaburzeniami ze strony przewodu pokarmowego jak też

groźnymi powikłaniami systemowymi w postaci hemolitycznego zespołu mocznicowego (HUS). Nosicielem i głównym źródłem tych bakterii jest bydło, które jednocześnie nie wykazuje żadnych objawów chorobowych. Drobnoustroje te bytujące jako mikroflora towarzysząca u zwierząt mogą powodować zanieczyszczenie tusz podczas uboju i obróbki mięsa na terenie rzeźni. Celem prowadzonych, we współpracy z doktorem Lotharem Beutinem z National Reference Laboratory for *Escherichia coli*, Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Berlin, Niemcy, badań było określenie występowania w Polsce u bydła i tuszach wołowych innych serotypów VTEC niż najbardziej powszechny O157:H7. Podczas realizacji projektu *ProSafeBeef: Improving the quality and safety of beef products for the consumer in production and processing* wyizolowano 32 szczepy VTEC, w tym ze skóry bydła rzeźnego i powierzchni tusz wołowych. Typowanie serologiczne i molekularne (PCR), wykonane w PIWet-PIB w Puławach oraz w BfR w Berlinie pozwoliło zidentyfikować szereg rzadko występujących grup serologicznych VTEC, np. O181:H49, O2:H32, O21:H25 i O174:H2. Większość szczepów posiadała gen *vtx2*, odpowiedzialny za wytwarzanie toksyny wero Vtx2, a niektóre z nich dodatkowo charakteryzowały się obecnością genu *vtx1*, odpowiedzialnego za wytwarzanie toksyny Vtx1. Wyniki te wskazują, że różne grupy serologiczne VTEC mogą być potencjalnie chorobotwórcze dla człowieka i stanowić zagrożenie zdrowia publicznego. Istnieje zatem konieczność monitorowania żywności w kierunku szerszego zakresu serotypów VTEC a nie tylko grupy O157:H7 jak jest to robione obecnie.

Ważniejsze publikacje będące efektem omówionych badań:

Wieczorek, K., L. Beutin, J. Osek. 2011. Rare VTEC serotypes of potential zoonotic risk isolated from bovine hides and carcasses. *Veterinary Record* 168:80-81

5.2.5. Badania nad występowaniem werotoksycznych *Escherichia coli*, w tym O104:H4, w żywności w Polsce

W latach 2007 – 2012 uczestniczyłam we wspomnianym już projekcie *ProSafeBeef: Improving the quality and safety of beef products for the consumer in production and processing*, w ramach którego określano m.in. występowanie u bydła, w tuszach wołowych i mięsie wołowym shigatoksycznych (werotoksycznych) *E. coli* (VTEC). Był to jeden z ważniejszych etapów badań związanych z oceną zagrożeń na

tle VTEC, w których uczestniczyłam od początku swojej kariery naukowej w PIWet-PIB w Puławach. Istotnym elementem tych badań była również ocena występowania tych drobnoustrojów w warzywach i owocach, co miało związek z epidemią pokarmową w Niemczech na tle serotypu VTEC O104:H4. Jej konsekwencją była konieczność zapewnienia certyfikatów bezpieczeństwa dla tego typu żywności, eksportowanej do krajów trzecich. Z tego względu, w Zakładzie Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego PIWet-PIB w Puławach, w pierwszym laboratorium w Polsce, zwalidowano, wdrożono a następnie akredytowano przez Polskie Centrum Akredytacji metodę umożliwiającą wykrywanie obecności VTEC, w tym serotypu O104:H4. Byłam osobą odpowiedzialną za wprowadzenie tej procedury do badań laboratoryjnych. Opierała się ona na identyfikacji tych bakterii przy zastosowaniu metody hodowlanej, połączonej z analizą molekularną, wykorzystującą reakcję łańcuchową polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR). Były to pierwsze tego typu badania w Polsce, które zostały oficjalnie uznane przez kraje importujące żywność pochodzenia roślinnego, w tym Federację Rosyjską. Podsumowując ten etap prowadzonych przeze mnie badań można było stwierdzić, że tego typu żywność, eksportowana z Polski do krajów trzecich jak też wprowadzana na rynek Unii Europejskiej, była bezpieczna pod względem braku werotoksycznych *E. coli*, w tym niezwykle groźnego dla ludzi serotypu O104:H4.

Ważniejsze publikacje będące efektem omówionych badań:

Łopatek, M., K. Wieczorek, J. Osek. 2012. Badania nad występowaniem werotoksycznych *Escherichia coli* w żywności w Polsce. *Medycyna Weterynaryjna* 68:488-492

5.2.6. Badania w ramach projektu CamCon - występowanie i charakterystyka molekularną *Campylobacter* spp. w stadach brojlerów

W 2010 r. w ramach uczestnictwa w projekcie *CamCon: Campylobacter control – novel approaches in primary poultry production* rozpoczęto badania dotyczące występowania *Campylobacter* spp. w stadach brojlerów. Ich celem jest opracowanie skutecznego programu zwalczania tych bakterii w produkcji pierwotnej w różnych krajach Europy. W realizacji projektu bierze udział 10 ośrodków naukowych z 7 państw (Norwegia, Dania, Wielka Brytania, Holandia, Portugalia, Hiszpania i Polska) a jest on finansowany w ramach 7 Programu Ramowego Unii Europejskiej. Te kompleksowe badania obejmują m.in. oceną warunków hodowli

drobiu (brojlerów), kosztów jego produkcji oraz stopnia zanieczyszczenia przez *Campylobacter* środowiska kurników i powietrza w budynkach produkcyjnych. Istotnym elementem badań jest też ocena występowania tych drobnoustrojów, charakterystyka fenotypowa i molekularna izolowanych szczepów oraz ocena ich oporności na substancje przeciwbakteryjne. Projekt jest obecnie w trakcie realizacji a uzyskane wyniki będą systematycznie publikowane w czasopismach naukowych.

Ważniejsze publikacje będące efektem omówionych badań:

1. Kania, I., P. Kusyk, K. Wieczorek, J. Osek. 2012. CamCon – projekt ograniczenia występowania bakterii *Campylobacter* w stadach brojlerów jako element zwalczania kamylobakteriozy. Polskie Drobiarstwo 1:34-35
2. Borck, B., H. Rosenquist, A. I. Soerensen, L. S. Larsen, J. Osek, K. Wieczorek, P. Kusyk, M. Cereda-Cuellar, R. Dolz, S. Urdaneta, B. David, M. Hofshagen, J. Wagenaar, N. Bolder, N. Williams, Y. Meregá, T. J. Humphrey. 2011. CamCon – Broiler production management in six European countries – similarities and differences. Proceedings of the 16th International Workshop on *Campylobacter*, *Chronobacter* & Related Organisms CHRO 2011, Vancouver, Canada, August 28 – September 1, 2011, p. 47

5.3. Podsumowanie dorobku naukowego

Na mój dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora składa się pięć oryginalnych prac badawczych (w czterech jestem pierwszym autorem), trzy prace przeglądowe (w jednej jako pierwszy autor) oraz 13 doniesień na konferencje krajowe i międzynarodowe (w siedmiu jestem pierwszym autorem). Po uzyskaniu stopnia doktora nauk weterynaryjnych opublikowałam 18 oryginalnych prac badawczych (w tym pięć publikacji składających się na oceniane osiągnięcie naukowe), z których w 17 jestem pierwszym autorem, 27 prac przeglądowych (w tym jedna publikacja wchodząca w skład osiągnięcia naukowego) i popularnonaukowych, w których 14 występuję jako pierwszy autor oraz 51 doniesień na konferencje krajowe i zagraniczne (w 30 jestem pierwszym autorem).

Łączna liczba punktów za publikacje w czasopismach ujętych na liście MNiSW wynosi **683** (punkty nie dzielone przez autorów), w tym po nadaniu stopnia doktora uzyskałam 548 punktów. Sumaryczny Impact Factor wynosi dla wszystkich prac **23,523**, z czego 19,569 stanowi IF uzyskany po nadaniu stopnia doktora. Dla prac

wybranych jako osiągnięcie naukowe uzyskałam łączny IF 8,945 oraz 155 punktów MNiSW.

Aktualna (stan na dzień 17.06.2013) liczba cytowań moich prac według bazy Web of Science wynosi **61** (40 bez autocytowań) a indeks Hirscha **4**.

6. Ważniejsze projekty krajowe i międzynarodowe⁴

1. Projekt 6 programu Ramowego Unii Europejskiej: ProSafeBeef: Improving the quality and safety of beef products for the consumer in production and processing; No. FOOD-CT-2006-36241 (2007-2012; 60 miesięcy), Work Packages: 1.2, 1.3. Całkowity budżet grantu: 17.783.356,00 Euro, w tym przypadający na PIWet-PIB w Puławach: 194.000,00 Euro.
2. Projekt 7 Programu Ramowego Unii Europejskiej: CamCon: *Campylobacter* control – novel approaches in primary poultry production; FP7-KBBE-2009-3-01, No. 244547 (2010-2014; 48 miesięcy), Work Packages: 1.1, 3.2, 4.2, 5.1, 6.2, 6.5. Całkowity budżet grantu: 3.767.806,00 Euro, w tym przypadający na PIWet-PIB w Puławach: 60.790,00 Euro.
3. Projekt badawczy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego: Identyfikacja i różnicowanie termotolerancyjnych izolatów *Campylobacter* w oparciu o wybrane metody biologii molekularnej; Nr 2 P06K 008 30 (2006 r.; 12 miesięcy), wartość grantu: 25 000 zł.
4. Projekt badawczy Narodowego Centrum Nauki: Badania mechanizmów lekooporności i chorobotwórczości *Campylobacter* izolowanych od drobiu; Nr N N308 237636 (2009-2012; 36 miesięcy), wartość grantu: 318 000 zł.

7. Nagrody i wyróżnienia⁵

Przed uzyskaniem stopnia doktora:

1. Nagroda Naukowa Wydziału Nauk Rolniczych, Leśnych i Weterynaryjnych PAN za 2005 r.

⁴ Wykaz wszystkich projektów krajowych i międzynarodowych zamieszczono w Załączniku 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

⁵ Szczegółowy wykaz i zakres uzyskanych nagród oraz wyróżnień zamieszczono w Załączniku 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

2. Nagroda Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych za 2006 r. w kategorii za wybitną monografię z zakresu nauk weterynaryjnych ogłoszoną w Medycynie Weterynaryjnej

Po uzyskaniu stopnia doktora:

1. Nagroda III stopnia za rok 2011 Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych za współautorstwo pracy.
2. Wyróżnienie za 2011 r. Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych za współautorstwo 2 prac.
3. Nagroda III stopnia za rok 2012 Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych za współautorstwo 2 prac.
4. Czterokrotnie Nagroda I stopnia oraz trzykrotnie Nagroda II stopnia Dyrektora PIWet-PIB w konkursie za najlepszą publikację.

8. Staże i szkolenia

1. Szkolenie: Kurs „Klonowanie molekularne” organizowany przez DNA-Gdańsk we współpracy z A&A Biotechnology (3 dni), 2004 r.
2. Szkolenie pt. „Podnoszenie umiejętności identyfikacji *Campylobacter*, w ramach wdrażania legislacji dotyczącej zoonoz” Zorganizowane zostało z inicjatywy komisji Unii Europejskiej, koordynującej przygotowanie i wdrożenie monitoringu tych patogenów w żywności pochodzenia zwierzęcego. Danish Institute for Food and Veterinary Research Aarhus, Dania, 26.02. - 02.03.2006 r.
3. Staż w laboratorium Food and Consumer Product Safety Authority, Zutphen, Holandia, 13 - 24.11.2006 r.
4. Staż w Laboratorium Referencyjnym Unii Europejskiej ds. *Campylobacter*, National Veterinary Institute, Uppsala, Szwecja, 4 - 8.12.2006 r.
5. Warsztaty WHO Global Salm-Surv, level-3 training course, organizowane przez Światową Organizację Zdrowia, Warszawa, 25 – 29.02.2008 r.

6. Staż w Laboratorium Referencyjnym Unii Europejskiej ds. Antybiotykooporności z zakresu antybiotykooporności *Campylobacter*, Technical University of Denmark (DTU), Kopenhaga, Dania, 2 - 7.03.2008 r.
7. Staż w Laboratorium Referencyjnym Unii Europejskiej ds. *Listeria monocytogenes* z zakresu typowania molekularnego *Listeria monocytogenes*, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety - ANSES, Francja, 28.09. - 03.10.2008 r.
8. Stypendium Norman E. Borlaug Agriculture Science and Technology Fellows Program, Michigan State University, Lansing, Michigan, USA, 11.09. – 25.10.2009 r.
9. Stypendium ProSafeBeef Training Exchange Programme, Environmental Science and Research Centre, Christchurch, Nowa Zelandia, 30.10. – 22.11.2009 r.
10. Udział w projekcie R779-2-3 „Comparison and characterization of *Campylobacter* from Poland, Malaysia and Australia, Division of Food and Nutritional Sciences, The Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO), Brisbane, Australia, 15.02. – 22.04.2011 r.
11. Staż w Laboratorium Referencyjnym Unii Europejskiej ds. *Escherichia coli* w tym werocytotoksycznych *E. coli* (VTEC) z zakresu wykrywania i identyfikacji werotoksycznych VTEC w żywności, Rzym, Włochy, 12 - 16.07.2011 r.
12. Staż w Krajowym Laboratorium Referencyjnym ds. *Campylobacter* z zakresu molekularnych technik badania mechanizmów antybiotykooporności *Campylobacter* spp., Federal Institute for Risk Assessment (BfR), National Reference Laboratory for *Campylobacter*, Unit of Food Hygiene and Safety Concepts, Department of Biological Safety, Berlin, Niemcy, 26.09 - 03.10.2011 r.
13. Szkolenie z zakresu molekularnych mechanizmów oporności na antybiotyki, Technical University of Denmark (DTU), Kopenhaga, Dania, 6 - 11.11.2011
14. Szkolenie: International Basic Training Workshop on BioNumerics® and GelCompar II®, Ghent, Belgia, 11 - 14.03. 2012 r.

15. Szkolenie Statistica STATISTICA kurs podstawowy, Kraków, 2 - 3.07.2012 r.

9. Udział w zespołach eksperckich i konkursowych

1. Członek zespołu ekspertów Narodowego Centrum Nauki, Panel NZ7: Zdrowie publiczne: epidemiologia, choroby cywilizacyjne i społeczne zagrożenia środowiskowe dla zdrowia ludzi i zwierząt, medyczna i weterynaryjna ochrona zdrowia publicznego, etyka, medycyna pracy, farmakoekonomika, w latach 2011-2012 (konkursy I i II) oraz Panel NZ7 (B–SONATA, PRELUDIUM): „Epidemiologia, choroby cywilizacyjne i społeczne zagrożenia środowiskowe dla zdrowia ludzi i zwierząt, medyczna i weterynaryjna ochrona zdrowia publicznego, medycyna pracy, nauki o lekach”, 2012 r. (konkurs III)
2. Członek zespołu ekspertów Narodowego Centrum Badań i Rozwoju przy przygotowaniu projektu strategicznego programu badań naukowych i prac rozwojowych w zdefiniowanym w Krajowym Programie Badań w obszarze środowisko naturalne, rolnictwo i leśnictwo - bezpieczeństwo żywnościowe i bezpieczeństwo żywności (2012-2013)
3. Członek zespołu ekspertów grupy roboczej ISO (w ramach Polskiego Komitetu Normalizacyjnego), obszar mikrobiologia żywności (od 2013 r.)

10. Udział w konferencjach międzynarodowych i krajowych⁶

1. International Conference “Protection against bioterrorism”, Puławy, 8-9 czerwca 2004
2. V Sesja Przeglądowa Analityki Żywności, Warszawa, 24 listopada 2004
3. Hygiena Alimentorum XXVI, Strbske Pleso, Słowacja, 25-27 maja 2005
4. Konferencja naukowa: „Żywnienie a zdrowie – interakcje”, Kraków, 9-10 czerwca 2005
5. Konferencja naukowa: „Technologia i Biotechnologia Żywności – teraźniejszość i przyszłość”, Szczecin, 13-14 września 2005
6. Symposium Naukowe: „Zoonozy – aktualne zagrożenia”, Warszawa, 24-25 marca 2006,
7. 13th World Congress of Food Science and Technology, Nantes, Francja, 17-21 września 2006

⁶ Tytuły wszystkich doniesień przedstawiono w Załączniku 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

8. 20th International ICFMH Symposium Food Micro 2006, Bolonia, Włochy, 2 sierpnia – 29 września 2006
9. 3rd International Conference on Quality and Safety in Food Production Chain. Wrocław, 13-15 czerwca 2007
10. III Konferencja „Medycyna Podróży”, Białystok, 12-14 października 2007
11. XXIX International Conference “Hygiena Alimentorum”, Strbske Pleso, Słowacja, 5-7 maja, 2008
12. 21st International ICFMH Food Micro Symposium “Evolving microbial food quality and safety”, Aberdeen, Szkocja, 1-4 września 2008
13. XIII Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych “Od nauki do praktyki”, Olsztyn, 18-20 września 2008
14. 1st Workshop on Microbiology in Health and Environmental Protection – Microbiot 2008, Łódź, 25-26 września, 2008
15. III Międzynarodowa Konferencja Naukowa “Una Medicina Una Hygiena”, Wrocław, 10-11 października 2008
16. International Conference “Ecology of Pathogenic *Escherichia coli*”, Oslo, Norwegia, 5-6 marca, 2009
17. International conference “Advancing beef safety through research and innovation”, Dublin, Irlandia, 25-26 marca, 2009
18. 3rd Congress of Microbiologists FEMS 2009, Gothenburg, Szwecja, 28 czerwca – 2 lipca, 2009
19. 15th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter*, and Related Organisms CHRO 2009, Niigata, Japonia, 2-5 września, 2009
20. International Conference “Control and Management of Pathogenic *Escherichia coli*”, Dublin, Irlandia, 17-18 września, 2009
21. 4th International Conference on “Quality and Safety in Food Production Chain”, Wrocław, 24-25 września 2009
22. 22nd International ICFMH Symposium Food Micro 2010, Kopenhaga, Dania, 30 sierpnia – 3 września 2010
23. International Conference “Advancing Beef safety and Quality through Research and Innovation”, Aberystwyth, Wales, Wielka Brytania, 6-7 października, 2010
24. IV Konferencja “Medycyna Podróży”, Białystok, 14-16 października 2010

25. 4th Congress of European Microbiologists FEMS 2011, Genewa, Szwajcaria, 26-30 czerwca, 2011
26. 16th International Workshop on *Campylobacter*, *Chronobacter* & Related Organisms CHRO 2011, Vancouver, Kanada, 28 sierpnia – 1 września, 2011
27. 5th International Conference on The Quality and Safety in Food Production Chain, Wrocław, 19-20 września 2011
28. International Conference “Advancing beef safety through research and innovation” organized by ProSafeBeef project, Dublin, Irlandia, 08-09 lutego 2012
29. 8th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections (VTEC 2012), Amsterdam, Holandia, 6-9 maja 2012
30. 23rd International ICFMH Symposium FoodMicro 2012, Istanbul, Turcja, 3 – 7 września 2012
31. XIV Kongres PTNW, Wrocław, 13-15 września 2012

Szczegółowy wykaz opublikowanych prac naukowych lub twórczych prac zawodowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki znajduje się w Załączniku 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

Puławy, 19.06.2013
Kinga Wierzbicki