

Autoreferat

dr n. wet. TOMASZ WACŁAW ŚNIEGOCKI

Zakład Farmakologii I Toksykologii

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy



Puławy, 2019

Spis treści

1	Imię i nazwisko.....	3
2	Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	3
3	Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych.....	3
4	Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.).....	4
4a	Tytuł osiągnięcia naukowego (jednotematyczny cykl publikacji).....	4
4b	Wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu.....	4
4c	Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	5
5	Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych.....	21
5a	Pozostały dorobek publikacyjny.....	21
5b	Udział w projektach badawczych.....	33
5c	Udział w sympozjach, konferencjach i kongresach.....	34
5d	Udział w kursach i szkoleniach.....	36
5e	Nagrody za działalność naukową.....	36
5f	Członkostwo w towarzystwach naukowych.....	37
5g	Działalność dydaktyczna.....	37
5h	Recenzowanie publikacji w czasopismach naukowych.....	37
5i	Działalność organizacyjna.....	38

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

4a) tytuł osiągnięcia naukowego (jednotematyczny cykl publikacji)¹

**Analityczna strategia oznaczania chloramfenikolu w żywności
pochodzenia zwierzęcego**

4b) wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu:

H1 Śniegocki T., Żmudzki J., Posyniak A., Sell B., In-house reference material of chloramphenicol in pig muscle. Bull Vet Inst Pulawy. 56, 601-604, 2012. (IF = 0,377; MNiSW = 20; ilość cytowań = 0)

Udział własny: opracowanie koncepcji prac, zaplanowanie doświadczeń, wykonanie oznaczeń, analitycznych, interpretacja wyników, sformułowanie wniosków, napisanie manuskryptu, wykonaniu korekty po recenzji – 75%.

H2 Śniegocki T., Posyniak A., Gbylik-Sikorska M., Żmudzki J., Determination of Chloramphenicol in Milk Using a QuEChERS-Based on Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method. Analytical Letters, 47: 568–578, 2014. (IF = 1,03; MNiSW = 20; ilość cytowań = 14)

Udział własny: opracowanie koncepcji prac, zaplanowanie doświadczeń, wykonanie oznaczeń, analitycznych, interpretacja wyników, sformułowanie wniosków, napisanie manuskryptu, wykonaniu korekty po recenzji – 80%.

H3 Śniegocki T., Gbylik-Sikorska M., Posyniak A., Transfer of Chloramphenicol from milk to commercial dairy products - Experimental Proof. Food Control. 57 411-418, 2015. (IF = 3,388; MNiSW = 35; ilość cytowań = 9)

Udział własny: opracowanie koncepcji prac, zaplanowanie doświadczeń, wykonanie oznaczeń analitycznych, interpretacja wyników, sformułowanie wniosków, napisanie manuskryptu, wykonaniu korekty po recenzji – 85%.

¹ Oświadczenia o indywidualnym wkładzie wszystkich współautorów stanowią Załącznik nr 6 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

H4 Śniegocki T., Gbylik-Sikorska M., Posyniak A., Analytical strategy for determination of chloramphenicol in different biological matrices by liquid chromatography - mass spectrometry. J Vet Res 61, 321-327, 2017 (**IF = 0,811; MNiSW = 15; ilość cytowań = 1**)

Udział własny: opracowanie koncepcji prac, zaplanowanie doświadczeń, wykonanie oznaczeń, analitycznych, interpretacja wyników, sformułowanie wniosków, napisanie manuskryptu, wykonaniu korekty po recenzji – 85%.

H5 Śniegocki T., Sell B., Giergiel M., Posyniak A., QuEChERS and HPLC-MS/MS combination for the determination of chloramphenicol in twenty two different matrices. Molecules 24(3), 384, 2019 (**IF = 3.098; MNiSW = 30; ilość cytowań = 0**)

Udział własny: opracowanie koncepcji prac, zaplanowanie doświadczeń, wykonanie oznaczeń, analitycznych, interpretacja wyników, sformułowanie wniosków, napisanie manuskryptu, wykonaniu korekty po recenzji – 85%.

Łączny współczynnik wpływu (**Impact Factor**) prac wchodzących w skład jednotematycznego cyklu publikacji (dla prac opublikowanych w roku 2019 przyjęto wskaźnik z roku 2017) wynosi **8,704**, a suma punktów wg listy czasopism punktowanych **MNiSW** (dla prac opublikowanych w roku 2019 przyjęto wskaźnik z roku 2017) wynosi: **120**.

4c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wstęp

Intensyfikacja produkcji zwierzęcej nastawionej na jak największe zyski przy minimalnych nakładach, wydaje się być niemożliwa bez stosowania leków weterynaryjnych.

Niezależnie od drogi podawania, substancje aktywne farmakologicznie przechodzą do różnych tkanek i narządów, a także do mleka, jaj i miodu, gdzie pozostają przez pewien określony czas.

W wyniku długoletnich badań i obserwacji wykazano, że pozostałości niektórych leków weterynaryjnych, między innymi chloramfenikolu, mogą negatywnie

oddziaływać na zdrowie konsumentów, w związku z tym wprowadzono zakaz ich stosowania u zwierząt wykorzystywanych do produkcji żywności.

Chloramfenikol (CAP), a dokładniej jeden z jego stereoizomerów (RR-p-CAP) został odkryty w 1947 roku przez Ehrlicha oraz niezależnie w tym samym roku przez Cartera (1,2). Związek ten był szeroko badany w latach 50 i 60 ubiegłego wieku. Ze względu na hamowanie syntezy białek, stał się doskonałym narzędziem dla biologów molekularnych i genetyków pracujących nad syntezą i funkcjami kwasu nukleinowego. Mechanizm działania przeciwbakteryjnego chloramfenikolu jest związany z hamowaniem biosyntezy białek w cytoplazmie komórki bakteryjnej poprzez wiązanie się z podjednostką 50S rybosomu bakteryjnego. Kompleks chloramfenikol-rybosom uniemożliwia przyłączanie aminoacylo-tRNA do rybosomu, co zakłóca prawidłową lokalizację peptydylotransferazy, enzymu katalizującego wydłużanie się łańcucha peptydowego (3).

Obecnie u ludzi, chloramfenikol stosowany jest miejscowo w zakażeniach skóry, oka i ucha, w postaci kropli, maści lub zawiesiny. Doustnie lub dożylnie może być stosowany w przebiegu duru brzuszego, zagrażających życiu zakażeń wywołanych przez *Haemophilus influenzae*, tularemii, riketsjoz, brucelozy, dżumy oraz ciężkich zakażeń bakteriami beztlenowymi, a także gruźlicy, tyfusu plamistego, paratyfusu, kokluszu i czerwonki (dysenteria) (3).

Zakres stężeń terapeutycznych dla chloramfenikolu u ludzi waha się 6,25–25 mg/kg, natomiast dla większości zwierząt - 25–50 mg/kg. Chloramfenikol dobrze się wchłania z przewodu pokarmowego i wiąże się z białkami krwi w ok. 50% (3,4). Dystrybucja chloramfenikolu w organizmie następuje szybko, najwyższe stężenie jest w wątrobie i nerkach, natomiast w płucach, śledzionie, sercu oraz mięśniach szkieletowych analogicznie do stężenia we krwi. Wysokie stężenie chloramfenikolu występuje również w cieczy wodnistej oka, oraz po 3-4 godzinach od podania, w płynie mózgowo-rdzeniowym, gdzie osiąga około 50% stężenia osiąganego w surowicy krwi. Chloramfenikol przenika przez łożysko, można go również znaleźć w mleku, gdzie uzyskuje około 75 % stężenia we krwi matki. Okres połowicznego zaniku chloramfenikolu u kur wynosi 7 godz., a u krów 4,5 godz. Jest on metabolizowany w wątrobie przede wszystkim poprzez łączenie się z kwasem glukuronowym, a wydalany jest głównie z moczem (6). Innym metabolitem powstającym również w wątrobie, ale też w jelicie grubym jest nitrochloramfenikol. Metabolit ten jest głównie odpowiedzialny za efekt toksyczny chloramfenikolu (7, 8).

Pomimo szerokiego spektrum działania przeciwbakteryjnego wskazania do stosowania chloramfenikolu są bardzo ograniczone ze względu na efekty uboczne. Lek ten u niemowląt może spowodować wystąpienie tzw. zespołu szarości (Gray syndrom), charakteryzującego się sinicą, obniżeniem temperatury ciała, dusznością

i w konsekwencji zapaścią. Wystąpienie tego zespołu jest spowodowane niezdolnością układu enzymatycznego wątroby niemowląt do sprzęgania tego leku z kwasem glukuronowym oraz upośledzeniem wydalania nerkowego (3,4). Wykazano również, iż w około 1:19000 przypadków chloramfenikol wywołuje reakcję idiosynkrazji (nagła reakcja organizmu, która nie zależy od dawki). Może również występować niedokrwistość aplastyczna, która jest spowodowana punktowymi mutacjami w mitochondrialnym DNA (9).

U ludzi rozpatrywane są dwa rodzaje toksycznego działania chloramfenikolu:

- Pierwszy, często występujący, związany z wielkością dawki i ustępujący po odstawieniu leku, którego powodem jest zahamowanie syntezy białka w komórkach szpiku kostnego podczas podawania chloramfenikolu. Związane jest to również z redukcją prekursorów krwinek czerwonych oraz zmniejszeniem prekursorów krwinek białych. Objawami chorobowymi są: łagodna postać anemii, obniżony poziom hemoglobiny oraz mała liczba retikulocytów we krwi obwodowej (10).
- Drugi, to anemia aplastyczna, która jest nieodwracalna i nie jest związana z dawką. Jest ona ciężkim rodzajem niedokrwistości ogólnej, która może też doprowadzić do białaczki. Ciężkie uszkodzenie szpiku kostnego u ludzi wywołane przez chloramfenikol jest stosunkowo rzadkie. Białaczka i anemia aplastyczna wywołana przez chloramfenikol może być związana również z uszkodzeniem DNA, a przyczyną jest tworzenie się nitrozochloramfenikolu, produktu redukcji grupy nitrowej chloramfenikolu. Zdolność do redukcji grupy nitrowej w pozycji para do pochodnej nitrozo jest charakterystyczna dla danego gatunku, ale też jest genetycznie określona i daje początek indywidualnej metabolicznej skłonności do uszkodzeń DNA wywołanych przez leki. Założenie to zostało oparte na badaniach *in vitro* i *in vivo* wskazujących, że hematologiczna odpowiedź na chloramfenikol u myszy jest częściowo dziedziczona. Potwierdza to również doświadczenie przeprowadzone przez nas na hepatocytach wyizolowanych od indyków i szczurów, gdzie występują statystycznie istotne różnice w stężeniach metabolitów chloramfenikolu występujących u tych dwóch gatunków zwierząt (11). U ludzi biochemiczny mechanizm odpowiedzialny za występowanie anemii aplastycznej nie jest dokładnie wyjaśniony. Innymi ubocznymi objawami są: bladość skóry, ból gardła, gorączka, wybroczyny, siniaki, zmęczenie oraz osłabienie (powyższe działania uboczne mogą również wystąpić do kilku tygodni lub miesięcy po zaprzestaniu przyjmowania chloramfenikolu) (12).

Zaobserwowany u ludzi rozwój anemii aplastycznej praktycznie nie występuje u zwierząt. Ostatnie badania potwierdziły poprzednie obserwacje, iż nie istnieje dokładnie sprecyzowany model anemii aplastycznej u zwierząt laboratoryjnych.

U świń, została określona dawka powodująca odwracalną degradację szpiku kostnego, która po 16 dniowej ekspozycji bursztynianem chloramfenikolu wynosiła 825 mg/kg. Wczesne oznaki toksyczności dla szpiku kostnego w badaniu krwi charakteryzują się niedoborem białych krwinek, a zwłaszcza limfocytów obojętnochłonnych. Inne objawy, które zostały zaobserwowane u zwierząt leczonych chloramfenikolem to: wymioty, biegunka, anoreksja oraz depresja. Potencjalne ryzyko poważnych działań toksycznych spowodowało ograniczenie stosowania chloramfenikolu zarówno w medycynie ludzkiej jak i weterynaryjnej (13).

Od 1994 roku stosowanie tego leku w krajach Unii Europejskiej u zwierząt wykorzystywanych do produkcji żywności zostało zabronione. W związku z potencjalną możliwością wystąpienia działań niepożądanych niezależnych od dawki nie określono limitu dopuszczalnego dziennego spożycia (ADI) (ang. *Acceptable Daily Intake*). Brak tego kryterium uniemożliwiło ustalenie najwyższego dopuszczalnego limitu pozostałości (MRL) chloramfenikolu w żywności zwierzęcego pochodzenia. Pomimo tego zakazu, jednak jest on nadal nielegalnie stosowany (14).

W ciągu ostatnich kilku lat pojawiły się liczne doniesienia opisujące szereg przypadków obecności pozostałości chloramfenikolu w żywności pochodzenia zwierzęcego. W krajach, w których do tej pory chloramfenikol jest dozwolony do stosowania, jego pozostałości były stwierdzane w mięśniach (króliki, drób, produkty akwakultury), a także miodzie, mleczku pszczelim oraz w mleku (15). Większość skażonej żywności pochodziła z południowo-wschodniej części Azji. Największym problemem były dodatnie próbki miodu pochodzące głównie z Chin oraz krewetek importowanych z Chin, Wietnamu, Indonezji, Tajlandii oraz Indii.

Szerokim echem w Unii Europejskiej odbiła się również „afery chloramfenikolowa”, która dotyczyła sprowadzanych z Indii w latach 2013-2015 preparatów enzymatycznych zawierających chloramfenikol, które mogą być stosowane jako dodatki paszowe, ale również mogą być dodawane do różnych produktów spożywczych (16).

W związku z toksycznością chloramfenikolu, zarówno unijne jak i polskie, akty prawne nakazują prowadzenie badań kontrolnych pozostałości w produktach pochodzenia zwierzęcego (tkanki, jaja, mleko, miód) oraz paszach (17).

W celu zabezpieczenia konsumenta przed spożywaniem żywności zawierającej pozostałości substancji niedozwolonych, a także swobodnego przepływu towarów w obrębie krajów UE, prowadzone są badania kontrolne pozostałości (18-23). Decyzją Komisji 96/23 wprowadzono obowiązek badania tych kontroli substancji (14). Zakres zalecanych badań obejmuje szereg grup związków chemicznych podzielonych na grupę A (substancje wykazujące działanie anaboliczne oraz związki, których

stosowanie u zwierząt jest niedozwolone) oraz grupę B (produkty lecznicze, zanieczyszczenia środowiskowe oraz inne zanieczyszczenia chemiczne). Ze względu na rangę badań kontrolnych pozostałości chemicznych, zostały określone kryteria, jakie muszą spełniać techniki analityczne, stosowane w oznaczeniach poszczególnych grup związków.

W latach 2009-2014 w UE w ramach programu kontroli pozostałości, co roku badanych jest około 400 000 próbek żywności i produktów pochodzenia zwierzęcego w kierunku obecności ponad 700 substancji niedozwolonych, lub których stężenie nie powinno przekraczać wyznaczonych limitów. Chloramfenikol, który jest jednym z kilkunastu związków należących do podgrupy A6 według raportów EFSA za lata 2009-2014 stwierdzono łącznie w 106 próbkach. Stanowi to 47% wyników niezgodnych z wszystkich wyników niezgodnych uzyskanych w podgrupie A6 w latach 2009-2014 (18-23).

Dlatego też, mając na uwadze to, że chloramfenikol jest najczęściej stosowanym lekiem niedozwolonym z podgrupy A6, a co za tym idzie, tak częste wykrywanie pozostałości chloramfenikolu oraz ochronę zdrowia konsumenta, powinno się dodatkowo zwiększyć kontrolę tej substancji. Kontrola pozostałości chloramfenikolu w żywności pochodzenia zwierzęcego, powinna się odbywać przy zastosowaniu odpowiednich, spełniających najwyższe wymagania procedur analitycznych, we właściwie przygotowanym materiale biologicznym.

Chloramfenikol jako substancja niedozwolona nie powinna występować w żywności i produktach pochodzenia zwierzęcego w najmniejszym nawet stężeniu (tolerancja „zero”).

Metodom analitycznym stosowanym do oznaczania chloramfenikolu stawiane są, wysokie wymagania, między innymi poprzez wyznaczenie minimalny poziom oznaczania (MRPL) (ang. *Minimum Required Performance Limit*), który na podstawie Decyzji Komisji 2003/181/WE wynosi 0,3 µg/kg (24). Jednak rozwój technik analitycznych oraz coraz ostrzejsze wymagania jakie stawiane są w analizie pozostałości, sprawiają, że wciąż istnieje potrzeba tworzenia nowych bardziej czułych, selektywnych, uniwersalnych i szybkich procedur.

Opracowywanie metod oznaczania pozostałości substancji niedozwolonych w wielu matrycach (różne rodzaje materiału biologicznego) to wieloetapowy i złożony proces, który musi uwzględnić dużą różnorodność parametrów takich jak zawartość tłuszczu, białka, wody, cukrów czy też różnych dodatków stosowanych w żywności. Z tego powodu, opracowanie metody zazwyczaj obejmuje optymalizację ekstrakcji analitu z próbki, oczyszczania otrzymanego ekstraktu oraz rozdziału i detekcji. Analizując dostępną literaturę można dojść do wniosku, że metody dzielimy na te

w których, chloramfenikol jest ekstrahowany przy użyciu techniki ciecz-ciecz oraz ciecz-ciało stałe lub kombinacji tych metod (25).

W ostatnich latach opracowano chromatograficzne metody oznaczania chloramfenikolu, w różnych matrycach oparte głównie na chromatografii gazowej i cieczowej oraz wykorzystujące różne formy detekcji. W chromatografii gazowej wykorzystywana jest obecność polarnych grup funkcyjnych (hydroksylowych), które dają możliwość reakcji z daną substancją z odpowiednim odczynnikiem. W wyniku czego poprawiona jest lotność, oraz stabilność termiczna substancji analizowanej. W przypadku chloramfenikolu stosuje się przyłączanie grup silanowych do poszczególnych grup funkcyjnych, dzięki czemu zwiększa się czułość detektora wychwyty elektronów (ECD) (ang. *Electron Capture Detector*) oraz spektrometru mas (MS). Reakcja silanizacji zwykle jest katalizowana przez kwasy albo zasady (25, 26).

W latach 90-tych XX wieku również detektor ECD był szeroko używany w analizie chloramfenikolu. Opisano między innymi metodę jego oznaczania w krewetkach, w której limit wykrywalności wynosił 1 µg/kg (27) oraz metodę oznaczania w mięśniach wieprzowych, gdzie limit wykrywalności wynosił 2 µg/kg (28). W przypadku połączenia chromatografii gazowej ze spektrometrią mas, najczęściej stosowanymi technikami jonizacji dla chloramfenikolu są jonizacja chemiczna (CI) (ang. *Chemical Ionisation*) i jonizacja elektronami (EI) (ang. *Electron Impact*). Ze względu na obecności dwóch atomów chloru w cząsteczce chloramfenikolu, chromatografia gazowa połączona ze spektrometrią mas w trybie negatywnej jonizacji chemicznej (NCI) (ang. *Negative Chemical Ionisation*) była jedną z najlepszych technik do analizy tego związku i dlatego też była to najczęściej używana metoda do potwierdzeń pozostałości chloramfenikolu na początku XXI wieku. Technika ta charakteryzuje się ograniczoną ilością fragmentów; jednakże, jon molekularny jest zawsze częścią spektrum. Granica wykrywalności tej metody w tkance mięśniowej wynosi < 0,1 µg/kg (25,26,29).

Rozwój nowej techniki jonizacji pod ciśnieniem atmosferycznym, w detektorach mas sprzężonych z chromatografią cieczową, przyczynił się do powstania niezawodnej techniki badania pozostałości chloramfenikolu, która jest obecnie najpowszechniejszą metodą oznaczania. Niemniej jednak brakuje metody, która pozwoliłaby na oznaczanie chloramfenikolu przy użyciu jednej metody dla jak największej ilości matryc oraz obejmujący różne etapy produkcji żywności pochodzenia zwierzęcego.

Dlatego też, celem niniejszego cyklu jest przedstawienie analitycznej strategii, zgodnej z powszechnie obowiązującymi normami, która rozwiązałaby problem oznaczania chloramfenikolu w sposób kompleksowy w jak największej ilości matryc oraz obejmujący różne etapy produkcji żywności pochodzenia zwierzęcego.

Cel podjętych badań

Opracowanie warsztatu metodycznego oznaczania pozostałości chloramfenikolu i jego głównego metabolitu oraz opracowanie analitycznej strategii, zgodnej z powszechnie obowiązującymi normami, która rozwiązałaby problem oznaczania chloramfenikolu w sposób kompleksowy i obejmujący szeroki zakres matryc na różnych etapach produkcji żywności pochodzenia zwierzęcego.

Przygotowanie i ocena materiału referencyjnego uzyskanego w laboratorium (H1).

Wymagania Unii Europejskiej dotyczące ochrony zdrowia konsumenta w zakresie bezpieczeństwa żywności, nakładają obowiązek monitorowania wielu grup leków weterynaryjnych. Program kontroli, który jest prowadzony w Unii Europejskiej dla pozostałości bada obecności ponad 700 substancji niedozwolonych oraz tych, których stężenie nie powinno przekraczać wyznaczonych limitów (18-23). Substancje te podzielone są na grupy w zależności od właściwości danej substancji oraz jej toksyczności.

Chloramfenikol ze względu na swoją toksyczność znajduje się w podgrupie A6 wraz z kilkunastoma innymi substancjami i jest jedną z najczęściej stwierdzanych/wykrywanych substancji niedozwolonych (47% z wszystkich wyników niezgodnych uzyskanych w podgrupie A6, 2009-2014) (18-23). Dlatego też konieczna jest wzmożona kontrola tej substancji w żywności pochodzenia zwierzęcego. Zwiększenie kontroli badanej substancji należy rozpocząć od sprawdzenia metod analitycznych, czy są odpowiednie oraz czy spełniają określone wymagania. Kluczowym zagadnieniem jest sprawdzenie procedury badawczej na prawidłowo dobranym i przechowywanym materiale biologicznym. Najlepszym materiałem do sprawdzania metod jest certyfikowany materiał referencyjny (CRM) (ang. *certified reference material*). Niestety, materiały te są bardzo drogie oraz trudno dostępne, a w przypadku chloramfenikolu nie są w ogóle dostępne.

W związku z tym, w celu sprawdzenia metody oraz wyeliminowania błędów mogących powstać ze względu na źle pobrany materiał do analizy, podjąłem się opracowania materiału referencyjnego wytworzonego i ocenionego w naszym laboratorium (HRM) (ang. *in-House Reference Material*) (H1). Materiał ten stanowiły mięśnie wieprzowe naturalnie skażone pozostałościami chloramfenikolu. Badanie jednorodności przygotowanego HRM jest zawsze pierwszym etapem w procesie oceny, ponieważ materiał biologiczny jest w pewnym stopniu heterogeniczny. Schemat badania jednorodności opierał się na statystycznej analizie wyników podwójnej analizy dla 10 próbek, zgodnie z raportem technicznym IUPAC (ang. *International Union of Pure and Applied Chemistry*) (30). Dzięki temu testowi można

łatwo sprawdzić tendencje i różnice między pierwszym i drugim testem oraz zewnętrznymi wynikami w próbkach. Weryfikację homogeniczności przeprowadziłem przy użyciu testu Cochrańa i testu wystarczającej jednorodności. Wartość testowa Cochrańa HRM była niższa od wartości krytycznej dla 10 par analizowanych w badaniu przy poziomie ufności 95%, co wskazuje na jednorodność przygotowanego materiału. W przypadku badania wystarczającej jednorodności, odchylenie standardowe próbki HRM było znacznie niższe niż wartość krytyczna dla tego testu (30). Oba testy statystyczne, potwierdziły jednorodność materiału referencyjnego. Wyniki badania stabilności CAP w mięśniach przechowywanych w temperaturze -20 ± 2 °C potwierdziły, że mierzalna degradacja nie wystąpiła, gdy materiał przechowywany był do 5 miesięcy w tej temperaturze. Analiza statystyczna wyników wykazała, że materiał może być użyty do dalszych celów przy sprawdzaniu oraz opracowywaniu nowych procedur badawczych oznaczania chloramfenikolu, a także podczas organizacji badań biegłości dla laboratoriów zewnętrznych.

Opracowanie szybkiej metody oznaczania chloramfenikolu z wykorzystaniem nowej techniki – QuEChERS (H2).

Przypadki występowania chloramfenikolu w mleku, oprócz mięśni są jednymi z najczęściej udokumentowywanych przypadków przez system szybkiego ostrzegania dla żywności i paszy (RASFF) (ang. *Rapid Alert System for Food and Feed*) (15). Dlatego też, ważne jest aby metoda oznaczania chloramfenikolu w mleku spełniała wysokie wymagania jakie stawia się dla metod do oznaczania leków niedozwolonych. Poza wykryciem analitu metody są zobligowane do dostarczenia informacji dotyczącej zawartości pozostałości w jak najkrótszym czasie nie tracąc przy tym na jakości uzyskanych wyników. W związku z tym, podjąłem się opracowania nowej i szybkiej metody. W przypadku analizy innych związków takich jak pestycydy została opracowana szybka i niedroga metoda - QuEChERS (ang. *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*). Metoda QuEChERS pozwala uzyskać powtarzalne rezultaty przy jak najmniejszej liczbie etapów pracy laboratoryjnej oraz przy niewielkim zużyciu odczynników. Metoda ta polega na ekstrakcji i podziale w układzie ciecz–ciecz składników próbki z użyciem rozpuszczalnika organicznego, a następnie oczyszczeniu ekstraktu z wykorzystaniem metody dyspersyjnej ekstrakcji do fazy stałej. Do momentu podjęcia przeze mnie badań przy użyciu tej techniki ukazała się tylko jedna publikacja dotycząca oznaczania chloramfenikolu w miodzie. Opracowana metoda oznaczania chloramfenikolu po raz pierwszy wykorzystuje tą technikę oczyszczania w analizie próbek mleka (H2). W wyniku przeprowadzonych badań ustalono, że współczynnik liniowości (r) miał wartość powyżej 0,99. Zakres roboczy

metody mieścił się w granicach od 0,1 µg/kg do 5,0 µg/kg. Wartość współczynnika zmienności (CV) charakteryzującego powtarzalność i odtwarzalność nie przekraczała 12%, odzysk od 91% do 110%. Oszacowano granicę oznaczalności metody - 0,1 µg/kg. Wyniki walidacji potwierdziły, że opracowana metoda spełnia wymagania jakie stawiane są dla metod przy użyciu, których oznaczane są leki niedozwolone do stosowania u zwierząt dostarczających żywność. Opracowana metoda została sprawdzona w badaniach biegłości oraz jest używana do oznaczania chloramfenikolu w mleku w Krajowym programie badań pozostałości. W ostatnich 3 latach przy użyciu tej metody potwierdzono kilka przypadków występowania chloramfenikolu w mleku co uwierzytelnia jej przydatność w rutynowych analizach.

Określenie stopnia przechodzenia chloramfenikolu z mleka do produktów mlecznych: serwatki, masła, sera, śmietany (H3).

Piśmiennictwo dotyczące chloramfenikolu skupia się przede wszystkim na badaniu toksyczności tego związku oraz możliwościach jego oznaczania. Natomiast informacje dotyczące przechodzenia chloramfenikolu do żywności przetworzonej są dostępne w bardzo ograniczonym zakresie i dotyczą tylko obróbki termicznej krewetek zawierających chloramfenikol (34). Nie ma natomiast żadnych informacji dotyczących przechodzenia chloramfenikolu do produktów mlecznych, co jest zaskakujące ze względu na fakt, że około 15 % próbek z wszystkich próbek zgłoszonych w ciągu ostatnich 12 lat do systemu RASFF to próbki mleka oraz jego przetwory (15). Występowanie pozostałości chloramfenikolu w mleku może wynikać z trzech powodów. Pierwszym jest nielegalne stosowanie tego leku w przebiegu Mastitis, które jest obecnie jedną z najczęściej występujących i najbardziej „kosztownych” chorób bydła mlecznego. Szacuje się, że corocznie na zapalenie wymienia zapada od 25% do nawet 50% krów na całym świecie (35). Drugą możliwością jest naturalna obecność CAP w uprawach roślinnych, w wyniku jego produkcji przez bakterie glebowe znajdujące się w ich naturalnym środowisku, a następnie wchłanianie przez rośliny uprawne, które mogą być wykorzystane do produkcji paszy (36). Ostatnią możliwością jest dodanie chloramfenikolu do mleka w celu zabezpieczenia mleka przed procesami fermentacyjnymi (H3).

W związku z tym podjąłem się sprawdzenia możliwości przechodzenia chloramfenikolu do produktów mlecznych po nielegalnym jego zastosowaniu w celu zabezpieczenia mleka przed procesami fermentacyjnymi. W pierwszym etapie badań opracowano metodę oznaczania chloramfenikolu w produktach mlecznych, serwatce, maśle, serze oraz śmietanie. Następnie przeprowadzono doświadczenie produkcji produktów mlecznych w warunkach laboratoryjnych i przebadano możliwość

przechodzenia chloramfenikolu (**H3**). W eksperymencie wykorzystano próbki mleka od krowy rasy Holsztyńsko-Fryzyjskiej z zawartością białka około 3,5% oraz zawartością tłuszczu 4,3%. Wszystkie pobrane próbki zostały sprawdzone, czy są wolne od pozostałości chloramfenikolu. Następnie próbki przechowywano w temperaturze $<-18^{\circ}\text{C}$, aż do eksperymentu. W celu obliczenia stężenia chloramfenikolu w mleku przeanalizowano leki dostępne na rynku oraz wielkość cystern w jakich mleko jest przewożone. Następnie wartość ta została jeszcze obniżona i dodana do próbki mleka. Kolejnym etapem było sprawdzenie próbki pod kątem jednorodności. Test ten opierał się na statystycznej analizie wyników podwójnej analizy dla 10 próbek, zgodnie z raportem technicznym IUPAC (30) oraz weryfikacji homogeniczności przeprowadzonej przy użyciu testu Cochra i testu wystarczającej jednorodności. Po przeprowadzeniu tych testów stwierdzono, że próbka mleka jest homogeniczna. Następnym etapem było poddanie mleka inkubacji w temperaturze pokojowej przez 32 h. W tym czasie zebrano śmietanę, z części której w wyniku wytrząsania otrzymano masło. Pozostałą dolną część sfermentowanego mleka podgrzano do temp. 50°C . Następnie odseparowano ser i otrzymano serwatkę. Każdy z otrzymanych produktów został przebadany na obecność pozostałości chloramfenikolu. Analiza wyników jednoznacznie dowiodła, że chloramfenikol przechodzi do produktów mlecznych, a uzyskane stężenia dla poszczególnych produktów wynosiły odpowiednio: masło $4,86\text{ }\mu\text{g/kg}$, śmietana $3,5\text{ }\mu\text{g/kg}$, ser $2,36\text{ }\mu\text{g/kg}$ oraz serwatka $0,14\text{ }\mu\text{g/kg}$. Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić że chloramfenikol kumuluje się bardziej w produktach zawierających więcej tłuszczu. Dodatkowo została również przeprowadzona weryfikacja homogeniczności otrzymanych materiałów przy użyciu testu Cochra i testu wystarczającej jednorodności.

Opracowanie metody oznaczania chloramfenikolu i jego głównego metabolitu glukuronianu chloramfenikolu w różnych matrycach (H4**).**

Posiadając informacje dotyczące przechodzenia chloramfenikolu do produktów mlecznych oraz dane literaturowe dotyczące wysokiej odporności chloramfenikolu na temperaturę podczas gotowania (34), a także potwierdzając obecność chloramfenikolu w matrycach takich jak: miód pitny czy też mleczko pszczele. Jednocześnie mając na uwadze informację na temat „afery chloramfenikolowej”, która wstrząsnęła rynkiem europejskim w latach 2013-2015 (15). Podjąłem się opracowania analitycznej strategii oznaczania chloramfenikolu dla 21 wybranych matryc, w których istnieje możliwość występowania pozostałości chloramfenikolu oraz etapy, na których powinno się badać pozostałości chloramfenikolu (**H4**):

- Etap 1, wczesne wykrywanie - oznaczanie w próbkach pobranych w gospodarstwie (woda, pasza, mocz, osocze).
- Etap 2, badanie obecności w jadalnych produktach nieprzetworzonych (mięśnie, wątroba, nerki, tłuszcz, jaja, mleko, miód).
- Etap 3, badanie obecności w żywności przetworzonej (kiełbasa, szynka, mięsne produkty mrożone, proszek jajeczny, masło, śmietana, ser, serwatka, mleko w proszku).

Takie podejście do oznaczania pozostałości zdecydowanie poprawia bezpieczeństwo żywności, a co za tym idzie również bezpieczeństwo konsumenta. Możliwość sprawdzenia obecności chloramfenikolu na 1 etapie, znacząco zmniejsza ryzyko występowania tej substancji na późniejszych etapach. Niemniej jednak pozostałe etapy znacząco ograniczają prawdopodobieństwo występowania chloramfenikolu w żywności pochodzenia zwierzęcego. Dodatkowo oprócz nowo opracowanej metody przy użyciu ekstrakcji ciecz-ciało stałe do oznaczania chloramfenikolu zaproponowałem także metodę do oznaczania chloramfenikolu i jego głównego metabolitu glukuronianu chloramfenikolu, który może występować w niektórych matrycach (**H4**). Opracowana metoda została poddana walidacji zgodnie z wymaganiami obowiązującymi w Unii Europejskiej. Wyznaczono następujące parametry charakteryzujące opracowaną metodę: liniowość, odzysk, powtarzalność i odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjną, niepewność i odporność metody, a także efekt matrycy. W wyniku przeprowadzonych badań ustalono, że współczynnik liniowości (r) miał wartość powyżej 0,99. Zakres roboczy metody mieścił się w granicach od 0,1 $\mu\text{g/kg}$ do 2,4 $\mu\text{g/kg}$. Wartość współczynnika zmienności (CV) charakteryzującego powtarzalność i odtwarzalność nie przekraczała 13,6%. Odzysk wahał się od 92% do 107%. Oszacowano granicę oznaczalności metody na poziomie 0,06 $\mu\text{g/kg}$ do 0,12 $\mu\text{g/kg}$, w zależności od matrycy. Wszystkie wyznaczone parametry spełniały wymagania jakie są stawiane dla metod potwierdzających do oznaczania leków niedozwolonych do stosowania u zwierząt wykorzystywanych do produkcji żywności. Uzyskane limity oznaczania dla poszczególnych matryc są poniżej minimalnego poziomu oznaczania (MRPL), który na podstawie Decyzji Komisji 2003/181/WE wynosi 0,3 $\mu\text{g/kg}$ (24).

Opracowanie metody oznaczania chloramfenikolu i jego głównego metabolitu glukuronianu opartej na QuEChERS (H5**).**

Bazując na swoich wcześniejszych doświadczeniach z poprzedniej publikacji dotyczących matryc, w jakich chloramfenikol może występować (**H4**) postanowiłem opracować metodę, która będzie również obejmowała tak szeroki zakres matryc, ale

jednocześnie będzie dużo prostsza i szybsza od poprzedniej, spełniając przy tym surowe wymagania analityczne oraz uwzględniając główny metabolit chloramfenikolu. Niestety opracowanie jednej, prostej metody dla tak dużej liczby różnorodnych matryc jest dość trudne ze względu na dużą zmienność wśród badanych materiałów w odniesieniu do zawartości tłuszczu (masło, śmietana, jaja, pasze), białka (śmietana, twaróg, jaja, pasza), wody (woda, serwatka, mocz, mięśnie), a także cukru (miód). Produkty mogą zawierać również dodatkowe witaminy, oleje, emulgatory, polepszacze smaku, sól i inne przyprawy. Ponadto miód jest trudną matrycą, ze względu na kompozycję cukrów, które stanowią jedną z najbardziej złożonych mieszanin naturalnych węglowodanów. Na koniec, wszystkie te różne matryce mogą zawierać zanieczyszczenia, które mogą mieć pewien wpływ na analizę przy użyciu chromatografii cieczowej i mogą prowadzić do szeregu koelucji i kontaminacji krzyżowych substancji badanej z zanieczyszczeniami.

Dlatego też opierając się o wcześniejsze doświadczenia (**H3**, **H4**) celem badań było opracowanie prostej, taniej i szybkiej metody z dobrym odzyskiem i dobrym oczyszczaniem ekstraktów metodą QuEChERS. W miejsce ekstrakcji ciecz-ciecz lub ekstrakcji ciecz-ciało stałe w celu potwierdzenia i ilościowego oznaczania pozostałości chloramfenikolu i glukuronianu chloramfenikolu (glukuronian jest przekształcany w chloramfenikol z zastosowaniem hydrolizy przy użyciu beta-glukuronidazy) w różnych matrycach (**H5**).

W pierwszym etapie badań dokonałem podziału matryc:

- Matryce, które wymagają etapu hydrolizy, w których chloramfenikol występuje w postaci glukuronianu chloramfenikolu (wątroba, nerki, mocz, osocze).
- Matryce, w których chloramfenikol jest obecny jako substancja macierzysta (masło, mleko, mięśnie, proszek jajeczny, produkty z akwakultury, miód, mleko w proszku, miód pitny, kiełbasa, szynka, salceson, jelita, tłuszcz i pasze).

Największym problemem było zaszeregowanie mięśni do jednej z wyżej wymienionych grup ze względu na fakt, że nie ma danych literaturowych świadczących o występowaniu chloramfenikolu w postaci glukuronianu w tej matrycy. Natomiast badania Kittler (37) i moje własne doświadczenia (**H4**), jednoznacznie wskazują, że uzyskane stężenie chloramfenikolu jest dużo wyższe przy zastosowaniu etapu hydrolizy. Dlatego też, zdecydowałem, że mięśnie również zostaną dodane do matryc, w których potrzebny jest etap hydrolizy. W wyniku optymalizacji etapu hydrolizy najbardziej powtarzalne wyniki, oraz brak obecności glukuronianu chloramfenikolu zostały uzyskane po 1 godzinie w temperaturze co najmniej 50 °C. Na podstawie doświadczeń z wcześniejszych badań (**H4**), do ekstrakcji postanowiłem wykorzystać acetonitryl, który stanowi dobry kompromis pomiędzy odzyskiem,

a „czystością” ekstraktów dla wszystkich testowanych matryc. Pozostałe parametry odczynników zostały wybrane w oparciu o doświadczenia zebrane podczas doboru warunków oznaczania CAP w produktach mlecznych (H4). Opracowana metoda została poddana walidacji zgodnie z obowiązującymi wymaganiami w Unii Europejskiej (24). Wyznaczono następujące parametry charakteryzujące opracowaną metodę: liniowość, odzysk, powtarzalność i odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjną, niepewność i odporność metody a także efekt matrycy. W wyniku przeprowadzonych badań ustalono, że współczynnik liniowości (r) miał wartość powyżej 0,98. Zakres roboczy metody mieścił się w granicach od 0,1 $\mu\text{g/kg}$ do 2,4 $\mu\text{g/kg}$. Wartość współczynnika zmienności (CV) charakteryzującego powtarzalność i odtwarzalność nie przekraczała 13,1%. Odzysk wahał się od 94.4% do 104.8%. Oszacowano granicę oznaczalności metody na poziomie 0,1 $\mu\text{g/kg}$ do 0,15 $\mu\text{g/kg}$ w zależności od matrycy. Wszystkie wyznaczone parametry spełniały wymagania jakie są stawiane dla metod potwierdzających do oznaczania leków niedozwolonych do stosowania u zwierząt wykorzystywanych do produkcji żywności. Uzyskane limity oznaczania podobnie jak we wcześniejszej publikacji (H4) znajdowały się poniżej wartości MRPL (0,3 $\mu\text{g/kg}$) (23).

Podsumowanie osiągnięć

- **Przygotowanie i ocena materiału referencyjnego uzyskanego w laboratorium (H1).**

Materiał stanowiły mięśnie wieprzowe z wbudowanymi naturalnie pozostałościami chloramfenikolu. Przygotowany materiał referencyjny został przebadany pod kątem jednorodności i stabilności. Analiza statystyczna wyników wykazała, że materiał może być użyty do sterowania jakością badań oraz posłużyć do dalszych celów przy opracowaniu nowych procedur badawczych oznaczania chloramfenikolu, a także podczas organizacji badań biegłości.

- **Opracowanie szybkiej metody oznaczania chloramfenikolu z wykorzystaniem nowej techniki – QuEChERS (H2).**

Opracowana metoda spełnia międzynarodowe wymagania analityczne i została wdrożona do realizacji Krajowego programu badań kontrolnych pozostałości u zwierząt i w żywności pochodzenia zwierzęcego. Przy użyciu tej metody potwierdzono kilka przypadków występowania chloramfenikolu w mleku co uwierzytelnia jej przydatność w rutynowych analizach.

- **Określenie stopnia przechodzenia chloramfenikolu z mleka do produktów mlecznych: serwatki, masła, sera, śmietany (H3).**

W wyniku przeprowadzonego doświadczenia udowodniono przechodzenie chloramfenikolu do produktów mlecznych oraz że można te pozostałości oznaczyć. Następnym tego doświadczenia jest rozszerzenie zakresu badań oznaczania pozostałości chloramfenikolu w produktach mlecznych.

- **Opracowanie metody oznaczania chloramfenikolu i jego głównego metabolitu glukuronianu chloramfenikolu w różnych matrycach (H4).**

Strategia ta opiera się na pobieraniu próbek do badań na różnych etapach produkcji i dystrybucji żywności. Zastosowanie tego typu strategii w analizie chloramfenikolu czy też innych grup leków zdecydowanie poprawi bezpieczeństwo żywności, a co za tym idzie również bezpieczeństwo konsumenta.

- **Opracowanie metody oznaczania chloramfenikolu i jego głównego metabolitu glukuronianu opartej na QuEChERS (H5).**

Opracowana metoda spełnia wymagania jakie są stawiane dla metod potwierdzających do oznaczania leków niedozwolonych. Metoda ta została wdrożona do realizacji Krajowego programu badań kontrolnych pozostałości u zwierząt i w żywności pochodzenia zwierzęcego.

Piśmiennictwo

1. Carter H.E., Gottlieb D., Anderson H.W.: Chloromycetin and streptothricin. Science 107, 172. 1948.
2. Ehrlich J., Bartz Q.R., Smith R.M., Joslyn D. A., Burkholder P.R.: Chloromycetin, a new antibiotic from a soil actinomycete. Science 106, 417. 1947.
3. Danysz A. Kompendium farmakologii i farmakoterapii dla lekarzy, farmaceutów i studentów PZWL, Wrocław, 2002
4. Smyth E.G, Pallett A.P.: Chloramphenicol. British Journal of Hospital Medicine, 39, 424–428. 1988.
5. Chen M., LeDuc B., Kerr S., Howe D., Williams D.A. : Identification of human UGT2B7 as the major isoform involved in the O-glucuronidation of chloramphenicol. Drug Metab Dispos. Mar;38(3):368-75. 2010.
6. Goodman J., Gilman B.: The pharmacological basis of therapeutics. 8th edition, Pergamon press, New York, 1125-1130. 1992.
7. Plumb D.C.: Veterinary Drug Handbook, 4th Ed., Ames: Iowa State Press, 166-169. 2002.
8. Wal J-M., Peleran J-C., Perdu E., Rao D., Bories G.: New aspects of metabolic conjugation of chloramphenicol. Drug Metab. Disp., 16, 635-639. 1988.

9. Vajda G., Békéssy G.: Occurrence of acute chloramphenicol poisoning (the so-called grey syndrome) in pigs. *Magyar Allatorvosok Lapja*, 36, 765–767. 1981.
10. West B.C., Devault G.A., Clement J.C., Williams D.M.: Aplastic anaemia associated with parenteral chloramphenicol: review of 10 cases, including the second case of possible increased risk with cimetidine. *Rev. Infect. Dis.*, 10, 1048-1051. 1988.
11. Radko L. , Minta M., Śniegocki T., Stypuła-Trębas S. : Cytotoxicity and biotransformation of chloramphenicol in cell cultures. Abstract Book, Systemic toxicity- 217, str. 159, 19-ty Kongres Europejskiego Towarzystwa Toksykologii in Vitro (European Society of Toxicology In Vitro - ESTIV), Juan-les-Pins, Francja, 17-20 październik 2016.
12. Yunis A.A.: Chloramphenicol: relation of structure to activity and toxicity. *Ann. Rev. Toxicol.*, 28, 83-100. 1988.
13. Turton J.A., Andrews C.M., Havard A.C., Williams T.C.: Studies on the haemotoxicity of chloramphenicol succinate in the Dunkin Hartley guinea pig. *International Journal of Experimental Pathology*, 83, 225–238. 2002.
14. Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC. *OJ L 125*, 23.5.1996, p. 10–32. 1996.
15. RASFF – the Rapid Alert System for Food and Feed. <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=search> ResultList.
16. Śniegocki T., Gbylik-Sikorska M., Posyniak A.: Analytical strategy for determination of chloramphenicol in different biological matrices by liquid chromatography - mass spectrometry. *J Vet Res* 61, 321-327, 2017.
17. Commission Regulation (EU) No 37/2010 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin (*OJ L 15*, 20.1.2010, p. 1). 2010.
18. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/sp.efsa.2011.EN-158>
19. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/sp.efsa.2012.EN-212>
20. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/sp.efsa.2013.EN-363>
21. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/sp.efsa.2014.EN-540>
22. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/sp.efsa.2015.EN-723>
23. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/sp.efsa.2016.EN-923>
24. Commission Decision 2003/181/EC, *Off J Eur Commun* 2003, L 71:17.
25. DECYZJA KOMISJI 2003/181/WE z dnia 13 marca 2003 r. zmieniająca decyzję 2002/657/WE w odniesieniu do ustalania minimalnych wymaganych wartości granicznych wydajności (MRPL) dla niektórych pozostałości w żywności pochodzenia zwierzęcego (notyfikowana jako dokument nr C(2003) 764). 2003.

26. Śniegocki T., Posyniak A., Żmudzki J.: Validation Of The Gas Chromatography-Mass Spectrometry Method For The Determination of Chloramphenicol Residues In Milk Bull Vet Inst Pulawy 50, 353-357. 2006.
27. Śniegocki T., Posyniak A., Żmudzki J.: Determination of Chloramphenicol Residues In Milk By Gas And Liquid Chromatography Mass Spectrometry Methods Bull Vet Inst Pulawy 51, 59-64. 2007.
28. Munns R.K., Holland D.C., Roybal J.E., Storey J.M., Long A.R., Stehly G.R., Plakas S.M.: Gas chromatographic determination of chloramphenicol residues in shrimp: interlaboratory study. J. AOAC Int., 77, 596-601. 1994.
29. Gude T., Preiss A., Rubach K.: Determination of chloramphenicol in muscle, liver, kidney and urine of pigs by means of immunoaffinity chromatography and gas chromatography with electron capture detection. J. Chromatogr. B, 673, 197-204. 1995.
30. Commission Decision 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. OJ L 221, 17.8.2002, p. 8–36.2002.
31. Thompson M., Ellison S.L.R., Wood R.: Pure Appl Chem 2006, 78, 145-196.
32. Bayo J., Moreno M.A., Prieta J., Diaz S., Suarez G., Dominguez L.: Determination of chloramphenicol in bovine milk by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. J AOAC Int 77, 854-859. 1994.
33. Chevalier M., Pochard M.F., Bel B.: Determination of chloramphenicol residues by reverse phase high-performance liquid chromatography in foies gras. Food Addit. Contam., 12, 101-106. 1995.
34. Anastassiades M., Lehotay S. J., Stajnbaher D., Schenk F. J.: Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solidphase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. J. AOAC Int. 86: 412–431. 2003.
35. Shakila R.J, Vyla S.A.P, Saravana Kumar R.: Stability of chloramphenicol residues in shrimp subjected to heat processing treatments. Food Microbiol 23:47–51. 2006.
36. <https://www.agrofakt.pl/zapalenie-wymienia-u-krow-przyczyny-zapobieganie/>
37. Berendsen B., Pikkemaat M., Römken P., Wegh R., van Sisseren M., Stolker L., Nielen M.: Occurrence of chloramphenicol in crops through natural production by bacteria in soil. J. Agric. Food Chem. 61 (17): 4004–4010. 2013.
38. Kittler K., Radeck W., Polzer J.: Investigations on the influence of hydrolysis on the total amount of marker residue and consequences. Conference Material, EuroResidue VIII, in Egmond aan Zee, the Netherlands pp. 129-131. 2016.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

Po wyłączeniu 5 prac oryginalnych stanowiących podstawę cyklu habilitacyjnego, na mój dorobek składa się:

- **23 publikacji naukowych**, z czego 15 powstało po doktoracie. 21 artykułów zostało opublikowanych w czasopiśmie z bazy Journal Citation Reports (JCR),
- **24 rozdziały w monografiach**,
- **60 referatów** lub komunikatów konferencyjnych, w tym 47 prezentowanych na konferencjach krajowych oraz 13 na konferencjach międzynarodowych,
- **10 instrukcji** dla laboratoriów ZHW,
- **1 patent**.

Sumaryczny IF według listy JCR, zgodnie z rokiem opublikowania: **39,201** (z czego prace opublikowane po doktoracie = **37,295**, w tym prace stanowiące osiągnięcie: **8,704**);

Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science: **169** (**148** bez autocytowań);

Indeks Hirscha według bazy Web of Science: **8**;

Suma punktów MNiSW = **555** (z czego prace opublikowane po doktoracie = **479**, w tym prace stanowiące osiągnięcie = **120**).

5a) Pozostały dorobek publikacyjny

- **Wykaz i omówienie publikacji naukowych przed uzyskaniem stopnia doktora nauk weterynaryjnych**

Oznaczanie sulfonamidów w miodzie

Pszczoły mogą być narażone na szereg czynników chorobotwórczych, takich jak pierwotniaki, bakterie, roztocza, grzyby i wirusy. Jedną z bardziej popularnych grup leków stosowanych nielegalnie w pszczelarstwie są sulfonamidy. Niestety zastosowanie tych substancji w leczeniu pszczoł powoduje występowanie pozostałości ich w miodzie, w wyniku czego taki miód nie może być wprowadzony do obrotu. Dlatego też w celu ochrony konsumenta zdecydowano się na opracowanie metody oznaczania sulfonamidów w miodzie. Zaproponowana metoda umożliwia oznaczanie siedmiu sulfonamidów na bardzo niskich stężeniach z użyciem detektora fluorescencyjnego, dzięki czemu procedura ta została włączona do programu kontroli pozostałości sulfonamidów w miodzie.

Efekty badań zostały przedstawione w następujących publikacjach:

Posyniak A., **Śniegocki T.**, Zmudzki J., *Solid phase extraction and liquid chromatography analysis of sulfonamide residues in honey*. Bull Vet Inst Pulawy. 46, 111-117, 2002. (IF₂₀₀₂= 0,244; MNiSW₂₀₀₂= 10; Liczba cytowań= 22)

Posyniak A., Zmudzki J., Niedzielska J., **Śniegocki T.**, Grzebalska A., *Sulfonamide residues in honey. Control and development of analytical procedure*. Apiacta. 38, 249-256, 2003. (IF₂₀₀₃= 0; MNiSW₂₀₀₃= 2; Liczba cytowań= 22).²

Oznaczanie β -agonistów w materiale biologicznym

Przez wiele lat, ze względu na swoje właściwości spazmolityczne leki β -agonistyczne były często stosowane. Niektóre z tych substancji używane są także obecnie w leczeniu dychawicy oskrzelowej. U ludzi i zwierząt jednym z efektów ubocznych ich długotrwałego stosowania jest przyrost masy mięśniowej, co często było nielegalnie wykorzystywane w sporcie oraz tuczu zwierząt. Ponadto mogą one powodować wiele skutków ubocznych takich jak: zaburzenia rytmu serca, pojawienie się nagłych skurczów komorowych powodujących utratę przytomności, a czasami po większych dawkach nawet zgon. Pod koniec XX wieku w literaturze toksykologicznej pojawiły się liczne doniesienia opisujące ostre przypadki zatruc u ludzi, które powiązano z występowaniem pozostałości klenbuterolu w żywności pochodzenia zwierzęcego. W Hiszpanii odnotowano 367 przypadków, we Francji 22 pacjentów miało kliniczne objawy, które powiązano ze spożyciem wątroby cielęcej z pozostałościami, również we Włoszech doszło do zatruc 16 osób po spożyciu steków, zawierających klenbuterol o stężeniu 0,5 mg/kg. Pomimo wprowadzenia zakazu stosowania klenbuterolu i innych β -agonistów u zwierząt przeznaczonych do produkcji żywności, nadal występują przypadki zatruc klenbuterolem. W Meksyku w 2004 i 2005 roku zanotowano w sumie 425 przypadków, gdzie po spożyciu wątroby cielęcej skażonej pozostałościami klenbuterolu zaobserwowano: częstoskurcze, niepokój, bóle mięśni, zawroty głowy, migrenę, zaczerwienienie twarzy. Dlatego też podjęto się zadania opracowania metody oznaczania β -agonistów w materiale biologicznym przy użyciu chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Opracowana metoda oznaczania leków β -agonistycznych w próbkach moczu i wątroby, jest selektywna i pozwala na oznaczenie najbardziej popularnych β -agonistów. Uzyskane wyniki walidacji potwierdzają jej przydatność do prowadzenia rutynowej kontroli pozostałości tych związków w żywności. Procedury zostały włączone do Krajowego systemu kontroli pozostałości chemicznych.

² Czasopismo APIACTA jest poza listą JRC, dlatego też wykaz cytowań tej publikacji jest oparty o Google Scholar

Efekty badań zostały przedstawione w następujących publikacjach:

Śniegocki T., Posyniak A., Zmudzki J., *Nielegalne stosowanie β -agonistycznych anabolików*. Medycyna Weterynaryjna. 59, 487-491, 2003. (IF₂₀₀₃= 0,19; MNiSW₂₀₀₃= 7; Liczba cytowań= 2)

Śniegocki T., Zmudzki J., Posyniak A., Semeniuk S., *Gas chromatography-mass spectrometric confirmatory method for the determination of clenbuterol residues in animal urine and liver samples*. Bull Vet Inst Pulawy. 47, 139-144, 2003. (IF₂₀₀₃= 0,19; MNiSW₂₀₀₃= 11; Liczba cytowań= 7)

Śniegocki T., Posyniak A., Zmudzki J., *Improved gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of clenbuterol and salbutamol in animal urine*. Bull Vet Inst Pulawy. 49, 443-447, 2005. (IF₂₀₀₅= 0,29; MNiSW₂₀₀₅= 10; Liczba cytowań= 3)

Oznaczanie chloramfenikolu w mleku

Chloramfenikol ze względu na to, że może być stosowany w leczeniu infekcji bakteryjnych, był powszechnie używanym antybiotykiem. Jednak ze względu na szereg działań niepożądanych został zakazany u zwierząt wykorzystywanych do produkcji żywności. Zakaz jego używania spowodował opracowanie wielu metod oznaczania chloramfenikolu przy użyciu detektorów klasycznych (UV-Vis, ECD). Niemniej jednak w związku z coraz większymi wymaganiami stawianymi przez Unię Europejską w zakresie oznaczania pozostałości chloramfenikolu, zaistniała potrzeba opracowania metod oznaczania tej substancji w mleku przy użyciu chromatografii gazowej lub cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Opracowana procedura została zwalidowana zgodnie z wymaganiami obowiązującymi dla metod potwierdzających, a wiarygodność wyników otrzymywanych tą metodą została wielokrotnie potwierdzona w międzynarodowych programach badań biegłości takich jak FAPAS. Metoda została, również wdrożona do realizacji Krajowego programu badań kontrolnych pozostałości chloramfenikolu w mleku.

Efekty badań zostały przedstawione w następujących publikacjach:

Śniegocki, T., Posyniak, A., Zmudzki J., *Validation of the gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of chloramphenicol residues in milk*. Bull Vet Inst Pulawy. 50, 353-357, 2006. (IF₂₀₀₆= 0,402; MNiSW₂₀₀₆= 10; Liczba cytowań= 8)

Śniegocki T., Posyniak A., Zmudzki J., *Determination of chloramphenicol residues in milk by gas and liquid chromatography mass spectrometry methods*. Bull Vet Inst Pulawy. 51 (1), 59, 2007. (IF₂₀₀₇= 0,273; MNiSW₂₀₀₇= 13; Liczba cytowań= 9)

Oznaczanie metabolitów nitrofuranów w materiale biologicznym pochodzenia zwierzęcego

Nitrofurany (furazolidon, furaldaton, nitrofurantoina i nitrofurazon) stosowane były w medycynie weterynaryjnej między innymi w leczeniu zakażenia dróg moczowych, przewodu pokarmowego, skóry, a także jako dodatki konserwujące do żywności. Wykorzystywano je również jako stymulatory wzrostu. Działania bakteriobójcze nitrofuranów obejmują szerokie spektrum mikroorganizmów. Ponadto nitrofurany mają właściwości przeciwpierwotniakowe i grzybobójcze. Ponieważ pozostałości nitrofuranów w produktach spożywczych zwierzęcego pochodzenia mogą być szkodliwe dla zdrowia człowieka w 1995 r. wprowadzono zakaz ich stosowania w krajach UE. W konsekwencji zostały one umieszczone na liście substancji, dla których nie można ustalić maksymalnego limitu pozostałości (MRL). Nitrofurany dość szybko ulegają metabolizmowi w organizmie zwierząt w związku z tym kontrolę pozostałości wykonuje się dla produktów rozkładu. W badaniach nad metabolizmem nitrofuranów ustalono, że produktem przemiany furazolidonu jest 3-amino-2-oksazolidon (AOZ), furaldatonu – 5-metylomorfolino-3-amino-2-oksazolidon (AMOZ), nitrofurantoiny – 1-aminohydantoina (AHD), a nitrofurazonu – semikarbazyd (SEM). Na podstawie Decyzji Komisji 2003/181/WE dla poszczególnych metabolitów nitrofuranów ustalono wartość MRPL (ang. Minimum Residue Performance Limit), jako wymagany minimalny poziom oznaczania, na poziomie 1,0 µg/kg. Ze względu na zakaz stosowania nitrofuranów u zwierząt, których produkty są przeznaczone do konsumpcji przez ludzi wymagane jest, aby metody służące do wykrywania i oznaczania produktów metabolizmu nitrofuranów oparte były o techniki chromatograficzne połączone ze spektrometrią mas. Przeprowadzone badania, porównujące różne metody izolacji metabolitów z materiału biologicznego wykazały, że opracowany sposób zapewniał największe odzyski metabolitów oraz stosunkowo krótki czas analizy. Opracowana metoda, umożliwia w jednym toku analitycznym, równoległe wykrywanie i oznaczanie pozostałości metabolitów nitrofuranów w mięśniach i jajach.

Efekty badań zostały przedstawione w następujących publikacjach:

Śniegocki T., Posyniak A., Żmudzki J., *Determination of nitrofuran metabolite residues in eggs by liquid chromatography-mass spectrometry*. Bull. of the Vet. Ins. in Pulawy. 52, 421-425, 2008. (IF₂₀₀₈= 0,337; MNiSW₂₀₀₅= 15; Liczba cytowań= 5)

Śniegocki T., Żmudzki J., Posyniak A., *Determination of nitrofuran metabolites in the poultry muscle and eggs by LC-MS*. FOLIA 56, 48-50, 2012. (IF₂₀₁₂= 0; MNiSW₂₀₁₂= 2; Liczba cytowań= 2)³

- **Wykaz i omówienie publikacji naukowych po uzyskaniu stopnia doktora nauk weterynaryjnych**

Oznaczanie melaminy w paszach

Problem toksyczności melaminy pojawił się w Stanach Zjednoczonych na przełomie 2006/2007 roku po wystąpieniu zachorowań i upadkach psów i kotów. W toku kolejnych doświadczeń udowodniono, że dodatek melaminy, wykrytej w glutenie pszennym importowanym z Chin, jest przyczyną zaburzeń zdrowia u zwierząt. Stwierdzono ponadto obecność tego związku w glutenie ryżowym, kukurydzianym i mące kukurydzianej oraz białku sojowym. Oprócz skażenia karmy dla psów i kotów w Stanach Zjednoczonych stwierdzono obecność melaminy także w paszach przeznaczonych dla świń, drobiu i ryb. Melamina była dodawana do pasz ze względu na wysoką zawartość azotu w cząsteczce (66% masy cząsteczki). A podstawową metodą oznaczania białka ogólnego w materiałach paszowych jest analiza zawartości azotu w próbce. Dodatkowo melamina jest bezbarwną, krystaliczną substancją dobrze rozpuszczalną w wodzie co powoduje że bardzo trudno ją wykryć. Największym problemem w oznaczaniu melaminy, że jest to stosunkowo niewielka cząsteczka, dlatego też wcześniej tą substancję oznaczało się wykorzystując reakcję z odpowiednim odczynnikiem w wyniku czego powstawała substancja o znacznie większej masie cząsteczkowej, dzięki czemu można było ją analizować przy użyciu chromatografii gazowej. Naszym celem było więc opracowanie szybkiej i łatwej metody oznaczania melaminy w paszach bez konieczności tworzenia pochodnej. Dlatego też w metodzie opracowanej z wykorzystaniem LC-MS/MS dokonano zmian w porównaniu do dotychczas stosowanych procedur. Do oczyszczania ekstraktów z pasz użyto kolumnienek. Analit eluowano alkaicznym acetonitrylem, a następnie eluat odparowywano w strumieniu azotu w temperaturze 45 °C przy użyciu bloku grzejącego. Po oczyszczaniu analit eluowano mieszaniną acetonitrylu z wodą. Zebrane eluaty filtrowano używając filtrów wirówkowych o średnicy porów 0,2 µm. Wykrywanie i oznaczanie melaminy wykonywano przy zastosowaniu chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Ze względu

³ Czasopismo FOLIA jest poza listą JRC, dlatego też wykaz cytowań tej publikacji jest oparty o Google Scholar

na wielkość cząsteczki, a co za tym idzie bardzo krótki czas retencji do oznaczania melaminy zastosowano nowatorskie rozwiązanie, w którym użyto do rozdzielania kolumny normalnej fazy dzięki czemu metoda ta z powodzeniem mogła być używana do oznaczania melaminy w paszach. Opracowane rozwiązanie analityczne w uproszczyło przygotowanie próbek do badań, a wiarygodność wyników otrzymywanych tą metodą została wielokrotnie potwierdzona w międzynarodowych programach badań biegłości takich jak FAPAS.

Efekty badań zostały przedstawione w następującej publikacji:

Śniegocki T., Sell B., Posyniak A., Żmudzki J., *Determination of melamine in feed by high performance liquid chromatography coupled mass spectrometry*. Bull Vet Inst Pulawy. 54, 543-547, 2010. (IF₂₀₁₀= 0,321; MNiSW₂₀₁₀= 13; Liczba cytowań= 1)

Oznaczanie fenikoli w materiale biologicznym pochodzenia zwierzęcego

Florfenikol i tiamfenikol są substancjami należącymi do grupy amfenikoli i mają podobne działanie do chloramfenikolu, ale w przeciwieństwie do niego są mniej toksyczne ze względu na brak grupy nitrowej. Substancje te są dopuszczone do stosowania u drobiu, i były szeroko stosowane w celu zwiększenia efektywności podawanej paszy i do przyspieszenia wzrostu zwierząt. Dlatego też nie można wykluczyć pozostałości tych leków w tkankach zwierząt, które mogą stwarzać zagrożenie dla zdrowia konsumentów, a zatem ważne jest kontrolowanie ich pozostałości w tkankach zwierzęcych. W związku z tym podjęto próbę opracowania procedury oznaczania tiamfenikolu i florfenikolu w materiale biologicznym pochodzenia zwierzęcego.

Konsekwencją przeprowadzonych badań było wdrożenie do praktyki laboratoryjnej procedury badawczej, spełniającej przyjęte w tym zakresie standardy światowe. Jednocześnie metoda ta stanowi ważny wkład w bezpieczeństwo żywności. Wiarygodność wyników otrzymywanych tą metodą została wielokrotnie potwierdzona w międzynarodowych programach badań biegłości takich jak FAPAS.

Efekty badań zostały przedstawione w następującej publikacji:

Śniegocki T., Posyniak A., Żmudzki J., *Determination of thiamphenicol and florphenicol in the chicken kidneys and liver by liquid chromatography-mass spectrometry*. Bull Vet Inst Pulawy. 55, 749-753, 2011. (IF₂₀₁₁= 0,414; MNiSW₂₀₁₁=13; Liczba cytowań=2)

Oznaczanie karbadoksu i olaquindoksu w paszach i tkankach

Karbadoks i olaquindoks należą do grupy syntetycznych leków przeciwbakteryjnych, które mogą być stosowane nielegalnie jako stymulatory wzrostu w dodatkach paszowych. Mając na względzie zdrowie oraz bezpieczeństwo konsumentów w Rozporządzeniu Rady (WE) nr 2788/98 Komisja Europejska zakazała stosowania karbadoksu i olaquindoksu jako dodatków paszowych, ze względu na możliwość wywoływania działań kancerogennych oraz mutagennych. Dlatego też, zaistniała potrzeba opracowania procedury badawczej, która umożliwi wykonywanie oznaczeń zawartości karbadoksu i olaquindoksu w paszach i tkankach. Ze względu na ich szybki metabolizm (karbadoks metabolizuje się do dezoksykarbadoksu, oraz kwasu chinoksalino-2-karboksylowego natomiast olaquindoks do kwasu 3-metylochinksalino-2-karboksylowego), związki te w produktach pochodzenia zwierzęcego oznacza się jako metabolity.

Do wykrywania i oznaczania zawartości karbadoksu i olaquindoksu w paszy zastosowano technikę chromatografii cieczowej z detektorem UV, która spełniała wymogi oznaczania tych związków w paszach. Natomiast do oznaczania ich metabolitów opracowano metodę, która po raz pierwszy na świecie pozwoliła na jednoczesne oznaczanie tych związków w jednym toku analitycznym. Użycie chromatografii cieczowej w połączeniu z spektrometrią mas z przystawką Selexion® do oznaczania tych związków ułatwiło opracowanie metody badawczej, która wyznaczyła nowy trend w oznaczaniu tych substancji, ale jednocześnie pozwalała na ograniczenie ilości odczynników wykazujących toksyczny wpływ na organizm ludzki używanych do analizy.

Efekty badań zostały przedstawione w następującej publikacji:

Sniegocki T., Gbylik-Sikorska M., Posyniak A., Zmudzki J., *Determination of carbadox and olaquinox metabolites in swine muscle by liquid chromatography/mass spectrometry*. J. of Chrom. B 944, 25-29. 2014. (IF₂₀₁₄= 2,78; MNI₂₀₁₄= 30; Liczba cytowań= 15)

Problem występowania antybiotyków w wodzie

Stosowanie substancji przeciwbakteryjnych (antybiotyków i chemoterapeutyków) jest jednym ze sposobów zwalczania infekcji u zwierząt hodowlanych. Substancje te są najczęściej podawane z wodą do picia. Niestety właściwości fizykochemiczne niektórych leków oraz stan systemów dozowania mogą powodować, że leki będą pozostawać znacznie dłużej w systemie pojenia drobiu, co może powodować różne nieprzewidziane efekty. Dlatego też celem badań było opracowanie metod

analitycznych umożliwiających wykrywanie i oznaczanie substancji przeciw bakteryjnych w wodzie oraz materiale biologicznym, a także ocena zagrożeń spowodowanych stałą ekspozycją śladowych ilości enrofloksacyny w wodzie na występowanie pozostałości i farmakokinetykę tkankową doksycykliny podawanej w dawkach terapeutycznych brojlerom zdrowym i zakażonym *Mycoplasma gallisepticum*.

Efekty badań zostały przedstawione w następujących publikacjach:

Gbylik-Sikorska M., Posyniak A., Mitrowska K., Gajda A., Błądek T., **Śniegocki T.**, Żmudzki J., *Occurrence of veterinary antibiotics and chemotherapeutics in fresh water, sediment, and fish of the rivers and lakes in Poland*. Bull Vet Inst Pulawy. 58 (3), 399-404, 2014. (IF₂₀₁₄= 0,357; MNiSW₂₀₁₄= 15; Liczba cytowań= 5)

Gbylik-Sikorska M., Posyniak A., **Śniegocki T.**, Żmudzki J., *Liquid chromatography–tandem mass spectrometry multiclass method for the determination of antibiotics residues in water samples from water supply systems in food-producing animal farms*. Chemosphere 119, 8-15, 2015. (IF₂₀₁₅= 3,499; MNiSW₂₀₁₅= 35; Liczba cytowań= 31)

Gbylik-Sikorska M., **Śniegocki T.**, Posyniak A., Sell B., Żmudzki J., Olszewska M., Tomczyk G., Sawicka A., *The influence of trace amount of enrofloxacin in water on the doxycycline residues in chicken tissues experimentally infected by Mycoplasma gallisepticum*. Toxicology Letters 2 (238), S67-S68, 2015. (IF₂₀₁₅= 3,858; MNiSW₂₀₁₅= 35; Liczba cytowań= 0)

Gbylik-Sikorska M., Posyniak A., **Śniegocki T.**, Sell B., Żmudzki J., Olszewska M., Tomczyk G., Sawicka A., *Influence of enrofloxacin traces in drinking water to doxycycline tissue pharmacokinetics in healthy and infected by Mycoplasma gallisepticum broiler chickens*. Food and Chemical Toxicology 90, 123-129 2016. (IF₂₀₁₆= 3,584; MNiSW₂₀₁₆= 35; Liczba cytowań= 2)

Gbylik-Sikorska M., Posyniak A., **Śniegocki T.**, Sell B., Gajda A., Tomczyk G., Żmudzki J., *Effect of doxycycline concentrations in chicken tissues as a consequence of permanent exposure to enrofloxacin traces in drinking water*. J Vet Res 60 (3), 293-299, 2016. (IF₂₀₁₆= 0,462; MNiSW₂₀₁₆= 20; Liczba cytowań= 1)

Oznaczanie neonikotynoidów w miodzie, pszczołach i trzmielach

Funkcjonowanie rolnictwa i dzikich roślin bez pszczół jest możliwe, ale konieczność tego wysiłku jest niewyobrażalna ze względu na rolę owada w świecie roślin. Nie od dziś bowiem wiadomo, że im częściej pszczoła odwiedzi dany kwiat, tym później lepszy i bardziej dorodny powstanie z niego owoc. Ponadto pszczoły są

jednym z najważniejszych owadów, z ekonomicznego punktu widzenia ze względu na wysoką produkcję miodu, wosku pszczelego, mleczka pszczelego, pyłków i propolisu. Wszystkie te produkty są szeroko stosowane w przemyśle spożywczym, kosmetycznym oraz w medycynie. W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat obserwuje się zespół masowego ginięcia rodzin pszczelich. Na ten stan ma wpływ wiele czynników (zanieczyszczenia, zmiany klimatyczne, pasożyty, patogeny, środki ochrony roślin, a zwłaszcza środki owadobójcze). Jedną z ważniejszych grup środków owadobójczych podejrzanych o masowe ginięcie rodzin pszczelich są neonikotynoidy. Dlatego też nasze badania skupiły się głównie na określeniu i potwierdzeniu obecności neonikotynoidów i niektórych ich metabolitów w próbkach pszczoł i miodzie. Zaproponowana metoda umożliwia oznaczanie 7 neonikotynoidów oraz 6 ich metabolitów w pszczołach i miodzie. Była to pierwsza metoda, która umożliwiała oznaczanie 13 neonikotynoidów i ich metabolitów w jednym toku analitycznym. Wartość metody została potwierdzona podczas analizy skażonych pszczoł, w których wykryto klotianidynę, imidaklopyrd oraz jeden z jego metabolitów mocznik imidaklopyrdu, a także wykrywając metabolity imidaklopyrdu (mocznik imidaklopyrdu) w trzmielach.

Efekty badań zostały przedstawione w następującej publikacji:

Gbylik-Sikorska M., **Sniegocki T.**, Posyniak A., *Determination of neonicotinoid insecticides and their metabolites in honey bee and honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. J. of Chrom. B 990, 132-140 2015. (IF₂₀₁₅= 2,694; MNiSW₂₀₁₅= 30; Liczba cytowań= 32)

Phelps J. D., Strang B. A. C. G., Gbylik-Sikorska M., **Sniegocki T.**, Posyniak A., Sherry D.F., *Imidacloprid slows the development of preference for rewarding food sources in bumblebees (*Bombus impatiens*)*. Ecotoxicology. March 2018, 27, Issue 2, pp 175–187 (IF₂₀₁₆= 1,951; MNiSW₂₀₁₇= 30; Liczba cytowań= 0)

Oznaczanie nitrofuranów i ich metabolitów w materiale biologicznym pochodzenia zwierzęcego

Nitrofurany (furazolidon, furaldaton, nitrofurantoina i nitrofurazon) stosowane były w medycynie weterynaryjnej między innymi w leczeniu zakażenia dróg moczowych, przewodu pokarmowego, skóry, a także jako dodatki konserwujące do żywności. Wykorzystywano je również jako stymulatory wzrostu. Działania bakteriobójcze nitrofuranów obejmują szerokie spektrum mikroorganizmów. Ponadto nitrofurany mają właściwości przeciwpierwotniakowe i grzybobójcze. Ponieważ pozostałości nitrofuranów w produktach spożywczych zwierzęcego pochodzenia

mogą być szkodliwe dla zdrowia człowieka w 1995 r. wprowadzono zakaz ich stosowania w krajach UE. W konsekwencji zostały one umieszczone na liście substancji, dla których nie można ustalić maksymalnego limitu pozostałości (MRL). Nitrofurany dość szybko ulegają metabolizmowi w organizmie zwierząt w związku z tym kontrolę pozostałości wykonuje się dla produktów rozkładu. Na podstawie Decyzji Komisji 2003/181/WE dla poszczególnych metabolitów nitrofuranów ustalono wartość MRPL (ang. Minimum Residue Performance Limit), jako wymagany minimalny poziom oznaczania, na poziomie 1,0 µg/kg. Ze względu na zakaz stosowania nitrofuranów u zwierząt, których produkty są przeznaczone do konsumpcji przez ludzi wymagane jest, aby metody służące do wykrywania i oznaczania produktów metabolizmu nitrofuranów oparte były o techniki chromatograficzne połączone ze spektrometrią mas. Przeprowadzone badania, porównujące różne metody izolacji metabolitów z materiału biologicznego wykazały, że opracowany sposób zapewniał największe odzyski metabolitów oraz stosunkowo krótki czas analizy. Opracowana metoda, umożliwia w jednym toku analitycznym, równoległe wykrywanie i oznaczanie pozostałości nitrofuranów ich metabolitów w ośmiu matrycach.

Efekty badań zostały przedstawione w następującej publikacji:

Śniegocki T., Giergiel M., Sell B., Posyniak A., *New method of analysis of nitrofurans and nitrofuran metabolites in different biological matrices using UHPLC-MS/MS*. J Vet Res 62 (2), 161-166, 2018. (IF₂₀₁₈= 0,811; MNiSW₂₀₁₈= 15; Liczba cytowań= 0)

Selektywna ekstrakcja/izolacja fosfolipidów surowicy krwi za pomocą kolumnienek żelowych modyfikowanych miedzią

Fosfolipidy są głównymi składnikami błon komórkowych należące do jednych z najbardziej kłopotliwych składników powodujących trudności w analizie próbek biologicznych do oznaczania ksenobiotyków za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej, zwłaszcza w połączeniu z tandemową spektrometrią mas (HPLC-MS/MS). Polarny charakter fosfolipidów będący konsekwencją obecności w ich strukturze naładowanych grup funkcyjnych, takich jak ujemnie naładowana grupa fosforanowa, czy dodatnie lub czwartorzędowe grupy aminowe powodują zakłócenia znane jako efekty matrycy. Może się to ujawnić w formie tłumienia lub wzmacnia sygnału w przypadku fosfolipidów towarzyszących podczas analizy ze wskazanym analitem. Fosfolipidy mogą również gromadzić się na kolumnie analitycznej. Może to powodować nieprzewidywalne tłumienie jonów i małą odtwarzalność. Fosfolipidy istnieją w kilku klasach. Jednak tylko fosfatydylocholiny i lizofosfatydylocholiny powodują największy efekt matrycy dla próbek surowicy i osocza w analizie

LC-MS/MS. Chociaż interferencje spowodowane przez fosfolipidy dotyczą głównie tłumienia intensywności jonów w LC-MS/MS i zmniejszenia czułości spektrometru mas, bardzo ważną wadą jest również zmniejszenie żywotności kolumny. Negatywne działanie fosfolipidów na LC-MS/MS wzbudziło zainteresowanie selektywnym usunięciem fosfolipidów. Dlatego też celem pracy było stworzenie kolumnienek wypełnionych żelazem krzemionkowym modyfikowanym miedzią (II) i ich zastosowanie do zatrzymywania fosfolipidów surowicy krwi w celu ich izolacji lub ekstrakcji oraz opracowanie metody oznaczania fosfolipidów w surowicy krwi w celu potwierdzenia przydatności opracowanych kolumnienek.

Efekty badań zostały przedstawione w następującej publikacji. Uzyskano również patent:

Flieger J., Tatarczak-Michalewska M., Kowalska A., Madejska A., **Śniegocki T.**, Sroka-Bartnicka A., Szymańska-Chargot M., *Effective phospholipid removal from plasma samples by solid phase extraction with the use of copper (II) modified silica gel cartridges*. J of Chrom B 1070, 1-6 2017 (IF₂₀₁₆= 2,462; MNiSW₂₀₁₇= 30; Liczba cytowań= 1)

Kolumna do izolacji fosfolipidów z płynów biologicznych zwłaszcza z surowicy krwi oraz sposób izolacji fosfolipidów. Patent nr: P.420026. z dnia 2016-12-29. Flieger J., Tatarczak-Michalewska M., Kowalska A., Madejska A., **Śniegocki T.**

Problematyka zatruc zwierząt w Polsce

Zatrucia zwierząt często są związane z wieloma aspektami społeczno-ekonomicznymi takimi jak straty ekonomiczne, emocjonalne, dochodzenia policyjne, sprawy sądowe, konflikty międzyludzkie, narażenie zagrożonych gatunków zwierząt (orły, niedźwiedzie, wilki, rysie). W przypadkach zatruc zwierząt najczęściej wykrywane są związki z grupy rodentycydów hydroksykumarynowych (bromadiolon i brodifakum), pestycydów karbaminianowych (karbofuran, bendiokarb), a także związki z grupy pestycydów fosforoorganicznych, kokcydiostatyków, mikotoksyn. Dlatego też podjęto próbę opracowania jednej metody, która umożliwi analizę wyżej wymienionych grup związków. Większość substancji z grupy pestycydów jest analizowana przy pomocy chromatografii gazowej, niestety analiza pestycydów karbaminianowych jest bardzo utrudniona ze względu na ich niestabilność termiczną. W związku z tym postanowiono zastosować do analizy wyżej wymienionych substancji, spektrometrię mas połączoną z wysokosprawną chromatografią cieczą. Dodatkowo aby skrócić czas ekstrakcji i oczyszczania próbek zastosowano technikę QuEChERS, która jest doskonałym kompromisem dla metod wieloskładnikowych

między czystością ekstraktów, a szybkością i łatwością wykonania analiz. Typowymi materiałami do badań toksykologicznych są: wątroba, treść żołądka oraz krew. Analizę potencjalnie toksycznych substancji wykonywano w wątrobie. Zaproponowana metoda umożliwia oznaczanie 61 związków z grupy rodentycydów, pestycydów karbaminianowych, pestycydów fosforoorganicznych, kokcydiostatyków i mikotoksyn w wątrobie. Jest to pierwsza metoda która w jednym prostym eksperymencie analitycznym wykrywa substancje toksyczne należące do tak szerokiego zakresu.

Efekty badań zostały przedstawione w następującej publikacji:

Sell B., **Śniegocki T.**, Zmudzki J., Posyniak A., *Development of an analytic procedure for the determination of multiclass compounds for forensic veterinary toxicology*. JAT 183-191 2018 (IF₂₀₁₆= 2,462; MNiSW₂₀₁₇=30; Liczba cytowań=0)

Oznaczanie tryptofanu i jego głównych metabolitów w płynie z przedniej komory oka u pacjentów z cukrzycą i zaćmą

Tryptofan jest niezbędnym aminokwasem, a jego metabolity są istotne dla zdrowia człowieka. Celem tego badania było ilościowe oznaczenie tryptofanu i jego głównych metabolitów, kynureniny i kwasu kynureninowego za pomocą metody LC-MS/MS. Badanie metabolizmu tryptofanu może pomóc w zrozumieniu etiologii oraz konsekwencji wielu chorób. Eksperymenty na płynie z przedniej komory oka sugerują, że neuroaktywne metabolity tryptofanu w szlaku kynureninowym mogą odgrywać istotną rolę w powstawaniu zaćmy u pacjentów cierpiących na cukrzycę. Podwyższenie poziomów kynureniny zaobserwowano wcześniej w soczewkach kataraktycznych. Nasze badanie wykazało zwiększoną zawartość kynureniny i kwasu kynureninowego oraz zwiększony stosunek tryptofanu/kynureniny w płynie oka u pacjentów z zaćmą cierpiących na cukrzycę. Uzyskane wyniki, podobnie jak dane literaturowe, potwierdzają, że metabolizm tryptofanu jest nie tylko rozregulowany podczas cukrzycy, ale także wpływa na powikłania okulistyczne.

Efekty badań zostały przedstawione w następującej publikacji:

Flieger J., Święch-Zubilewicz A., **Śniegocki T.**, Dolar-Szczasny J., Pizoń M., *Determination of Tryptophan and Its Major Metabolites in Fluid from the Anterior Chamber of the Eye in Diabetic Patients with Cataract by Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS/MS)*. Molecules 2018, 23(11), 3012; (IF₂₀₁₇= 3,098; MNiSW₂₀₁₇= 30; Liczba cytowań= 0)

5b) Udział w projektach badawczych

Projekt badawczy promotorski KBN nr No. 2PO6K02230: Opracowanie i walidacja metod oznaczania pozostałości chemicznych w żywności pochodzenia zwierzęcego, 2006-2008, **główny wykonawca;**

Projekt badawczy: Zatrucia u zwierząt-diagnostyka laboratoryjna, 2008-2011, **wykonawca;**

Projekt badawczy NCN nr NN 308237138: Badania nad wykrywaniem toksyny botulinowej w materiale biologicznym, 2010-2013, **wykonawca;**

Projekt badawczy NCN nr NN 308-575540: Wpływ infekcji wywołanej przez *Actinobacillus pleuropneumoniae* na farmakokinetykę tkankową tulatromycyny u świń, 2011-2014, **wykonawca;**

Projekt badawczy rozwojowy NCBiR nr NR 12-0127-10: Zwierzęta wolno żyjące jako wskaźnik zanieczyszczeń środowiskowych i ważny element strategii bezpieczeństwa żywnościowego kraju. Wolno żyjące ryby słodkowodne jako wskaźnik skażenia wód powierzchniowych lekami przeciwbakteryjnymi, 2011-2014, **wykonawca;**

Projekt badawczy: Zastosowanie chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas w potwierdzającej analizie pozostałości leków przeciwbakteryjnych z grupy β -laktamów i aminoglikozydów w tkankach zwierząt, 2012-2013, **wykonawca;**

Projekt badawczy: Analityka i kinetyka przechodzenia leków weterynaryjnych oraz insektycydów neonikotynoidowych i innych pestycydów do organizmu pszczoł i produktów pszczelich, 2013-2015, **wykonawca;**

Projekt badawczy: Monitorowanie stanu zdrowotnego i strat rodzin pszczelich w krajowych pasiekach, 2013-2017, **wykonawca;**

Projekt badawczy KNOW2015/PIWet-PIB/LAB1/7: Doskonalenie metod w zakresie oznaczania zawartości ksenobiotyków w żywności pochodzenia zwierzęcego, środkach żywienia zwierząt i próbkach środowiskowych. 2015-2017, **kierownik;**

Projekt badawczy: Wpływ diety bogatej w rośliny krzyżowe na występowanie endogennego tiouracylu w moczu i mleku bydła, 2016, **wykonawca;**

Projekt badawczy: Doskonalenie metod laboratoryjnej diagnostyki toksykologicznej, 2017-2018, **wykonawca;**

Projekt badawczy finansowany z funduszu badań własnych: Wpływ olejków eterycznych (karwakrol) na szybkość zanikania antybiotyku (florfenikol) w tkankach

drobiu. **2019-2020, kierownik;**

Projekt badawczy: Pióra kurze jako matryca doskonała w analizie leków zakazanych.
2019-2020, kierownik;

5c) Udział w sympozjach, konferencjach i kongresach

Konferencje międzynarodowe:

17th International Mass Spectrometry Conference, Praga, Czechy, 2006. 08.27-09.01.

Conference on Residue of Veterinary Drugs in Food (EuroResidue VI), Egmond aan Zee, Holandia, 2008. 05.18-21.

Hygiena Alimentorum XXXIII "Safety and quality of poultry, fish and game products", Strbske Pleso – Vysoke Tatry, Słowacja, 2012.05.09-11.

RAFA 2017: 8th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, Praga, Czechy, 07-10.11.2017

Konferencje krajowe:

V Sesja Przeglądowa Analityki Żywności, Warszawa 24.11.2004.

VII Polskiej Konferencji Chemii Analitycznej „Analityka w rozwoju cywilizacji”, Komitet Chemii Analitycznej PAN, Toruń, 2005.07.03-07.

VII Konferencja Chromatograficzna "Chromatografia i techniki pokrewne a zdrowie człowieka", Białystok, 2006.09.10-13.

Konferencja Naukowa „Nowoczesne techniki badawcze w ocenie jakości produktów leczniczych”, Lublin, 2006. 09.21-22.

IX Krajowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego, Jubileusz 33-lecia PTToks, Szczyrk, 2008.09.8-12.

XIII Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych „Od nauki do praktyki”, Olsztyn, 2008.09.18-20.

Konferencja Naukowa „Leki weterynaryjne i zanieczyszczenia środowiskowe w żywności i w paszach – aspekty analityczne i ochrona zdrowia publicznego”, Puławy, 2009.06.23-24 – **doniesienie ustne.**

XVII Konferencja dotycząca problemów związanych z oznaczeniami fosforanów, tłuszczu, wody, NaCl, białka, skrobi, popiołu, hydroksyproliny oraz azotanów i azotynów w produktach mięsnych. Nowe kierunki badań. Puławy, 2009.05.11-12.– **doniesienie ustne.**

XXVII Konferencja Naukowo - Techniczna – Międzynarodowa „Analiza zagrożeń i analiza ryzyka w łańcuchu paszowym”, Zwierzyniec, 2010.04.22-23 – **doniesienie ustne.**

Konferencja naukowa „Farmakologiczne i toksykologiczne aspekty działania ksenobiotyków”, Olsztyn, 2010.06.24-25 – **doniesienie ustne.**

„Materiały i dodatki paszowe – aktualne wymagania” – materiały z Konferencji w Kazimierzu Dolnym, 28-29. 03. 2011 – **doniesienie ustne.**

Toksykologia w ocenie bezpieczeństwa chemicznego ludności, PTToks Warszawa, 2011.09.19-22.

XXVIII Konferencja Naukowo-Techniczna-Międzynarodowa, Kazimierz Dolny, 2011.03.28-29 – **doniesienie ustne.**

X Szkoleniowo-Naukowa Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego „Toksykologia w służbie publicznej”, Jurata, 2011.09.19-22 – **doniesienie ustne.**

14 Konferencja „Kontrola bezpieczeństwa i jakości pasz” Kazimierz Dolny 2014.04.28-29. – **doniesienie ustne.**

XI Konferencja szkoleniowo-naukowa Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego „Człowiek, żywność, środowisko – Problemy współczesnej toksykologii” Olsztyn 2014.09.16-19. – **doniesienie ustne.**

18th international symposium on advances in extraction technologies & 22nd international symposium on separation sciences. Toruń, 2016.07.3-6.

24th International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques oraz XI Polska Konferencja Chromatograficzna, Sopot, 2017.09.10-13.

XII Konferencja Szkoleniowo-Naukowa Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego "Różne oblicza toksykologii,, Puławy, 2017.09.19-22.

V Konferencja Naukowo-Szkoleniowa „Innowacje w medycynie i farmakoterapii”- cz.II Hotel Arłamów k. Ustrzyk Dolnych, 2018.11.8-10. – **doniesienie ustne.**

5d) Udział w kursach i szkoleniach

Szkolenia międzynarodowe:

1. Ecole Nationale Veterinaire de Nantes, Francja, kurs "School for Advanced Residue Analysis in Food"(październik 2001) - **stypendysta rządu Francuskiego**
2. Ecole Nationale Veterinaire de Nantes, Francja, kurs "School for Advanced Residue Analysis in Food"(marzec-kwiecień 2002) - **stypendysta rządu Francuskiego**
3. Projekt PHARE PL2003/004-379-04.01.03. Wykrywanie i oznaczanie pozostałości leków przeciwbakteryjnych metodami chromatografii i spektrometrii mas (Puławy, czerwiec 2006)
4. Projekt PHARE PL2003/004-379-04.01.03. Kokcydiostatyki w paszach i ich pozostałości w tkankach zwierząt i żywności zwierzęcego pochodzenia (Puławy, czerwiec 2006)
5. Projekt PHARE PL2003/004-379-04.01.03. Oznaczanie pozostałości hormonów anabolicznych i leków weterynaryjnych metodą spektrometrii mas (Puławy lipiec 2006)
6. Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Teramo, Włochy. Methods of drug residues detection, part II (wrzesień - październik 2006).

Szkolenia krajowe:

"Warsztaty na temat platformy Web of Knowledge 5", Thomson Reuters, Puławy, 5.12.2011;

Szkolenia z obsługi zestawów LC i LC/MS/MS firm Varian, Shimadzu, Agilent i ABSciex, Puławy, 2003-2018 (18 szkoleń).

Szkolenia z zakresu zapewnienia systemu jakości badań, Puławy, 2004-2018 (31 szkoleń).

5e) Nagrody za działalność naukową

- Nagroda III stopnia przyznana przez Dyrektora PIWet-PIB w 2015 w konkursie na najlepszą publikację pracowników naukowych w kategorii prac oryginalnych: "Determination of carbadox and olaquinox metabolites determination in swine muscle by liquid chromatography/massspectrometry", Journal Chromatography B 2014, 944, 25-29. **Sniegocki T.**, Gbylik-Sikorska M., Posyniak A., Zmudzki J..
- Nagroda II stopnia przyznana przez Dyrektora PIWet-PIB w 2015 w konkursie na najlepszą publikację pracowników naukowych w kategorii prac oryginalnych: Liquid chromatography–tandem mass spectrometry multiclass method for the determination of antibiotics residues in water samples from water supply systems in food-producing animal farms", Chemosphere 2015

119, 8-15. Gbylik-Sikorska M., **Sniegocki T.**, Posyniak A., Zmudzki J..

- Nagroda III stopnia przyznana przez Dyrektora PIWet-PIB w 2016 w konkursie na najlepszą publikację pracowników naukowych w kategorii prac oryginalnych: "Transfer of chloramphenicol from milk to commercial dairy products—Experimental proof", *Food Control* 2016, 57, 411-418. **Sniegocki T.**, Gbylik-Sikorska M., Posyniak A..

5f) członkostwo w towarzystwach naukowych

- Członek Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego (od 2008);

5g) działalność dydaktyczna

Od 2003 r. w ramach działalności referencyjnej prowadzę szkolenia dla pracowników laboratoriów Zakładów Higieny Weterynaryjnej z zakresu leków niedozwolonych. Jestem również autorem 10 instrukcji, które zostały wdrożone w laboratoriach Zakładów Higieny Weterynaryjnej.

Ponadto w trakcie pracy zawodowej, w latach 2014-2019 prowadziłem wykłady na szkoleniach specjalizacyjnych w ramach szkoleń organizowanych przez Główny Inspektorat Weterynarii (GIW) przeznaczonych dla inspekcji weterynaryjnej.

Byłem również promotorem pomocniczym pracy doktorskiej dr Małgorzaty Gbylik-Sikorskiej (tytuł rozprawy doktorskiej „Występowanie leków przeciwbakteryjnych w systemach dozowania wody dla drobiu — analiza i ocena zagrożeń”) obronionej w 2016 r. z wyróżnieniem w PIWet-PIB w Puławach. Jestem także promotorem pomocniczym pracy doktorskiej lek. wet. Bartosza Sell pod tytułem „Zatrucia zwierząt rodentycydami antykoagulacyjnymi — aspekty analityczne i ocena zagrożeń”.

5h) Recenzowanie publikacji w czasopismach naukowych

W trakcie pracy zawodowej recenzowałem kilkadziesiąt artykułów naukowych dla czasopism indeksowanych w Thomson Reuters Journal Citation Reports: *Journal of Chromatography A*, *Journal of Chromatography B*, *Talanta*, *Analitica Chimica Acta*, *Analytical Letters*, *Food Chemistry*, *Analytical Methods*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *Analytical Chemistry*, *Food Additives & Contaminants: Part A*, *Food Analytical Methods*, *Food Control*, *Foods*, *Environment International*, *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*.

5i) Działalność organizacyjna

Jestem autorem 8 procedur badawczych oraz 3 instrukcji do Księgi Jakości Zakładu. W ramach działalności Krajowego programu referencyjnego ds. pozostałości leków weterynaryjnych i substancji niedozwolonych w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii współorganizuje krajowe badania biegłości z zakresu oznaczania chloramfenikolu, β -agonistów, metabolitów nitrofuranów oraz neuroleptyków w materiale biologicznym. Jestem autorem lub współautorem ponad 20 sprawozdań i raportów z badań biegłości zorganizowanych dla laboratoriów ZHW w latach 2006-2018.

Dodatkowo w obrębie prowadzonych działań z zakresu referencyjności brałem udział w opracowywaniu corocznego planu pobierania i przesyłania do badań kontrolnych pozostałości oznaczania chloramfenikolu, β -agonistów, metabolitów nitrofuranów, neuroleptyków w tkankach zwierząt oraz brałem czynny udział tworzeniu corocznego raportu z Krajowych badań kontrolnych (2006-2018).

Putawy 2019.02.25 Tomasz Szepoch

Errata

Strona 37 punkt 5g

Jest:

Jestem zaangażowany w działalność referencyjną realizowaną w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii PIWet-PIB i od 2003 r. i w ramach tej aktywności, prowadzę szkolenia i opracowuję instrukcje dla pracowników laboratoriów Zakładów Higieny Weterynaryjnej (ZHW).

Ponadto w trakcie pracy zawodowej prowadziłem wykłady na szkoleniach specjalizacyjnych dla lekarzy weterynarii w Weterynaryjnym Centrum kształcenia Podyplomowego w Puławach oraz dla Głównego Inspektoratu Weterynarii (GIW) w ramach Programu Wieloletniego 2014-2019, a także dla Powiatowych oraz Granicznych Inspektoratów Weterynarii.

Powinno być:

Od 2003 r. w ramach działalności referencyjnej prowadzę szkolenia dla pracowników laboratoriów Zakładów Higieny Weterynaryjnej z zakresu leków niedozwolonych. Jestem również autorem 10 instrukcji, które zostały wdrożone w laboratoriach Zakładów Higieny Weterynaryjnej.

Ponadto w trakcie pracy zawodowej, w latach 2014-2019 prowadziłem wykłady na szkoleniach specjalizacyjnych w ramach szkoleń organizowanych przez Główny Inspektorat Weterynarii (GIW) przeznaczonych dla inspekcji weterynaryjnej.

Errata została również wysłana do Centralnej Komisji ds. Stopni i Tytułów