

Załącznik b) do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

# **AUTOREFERAT**

**dr n. wet. Dariusz Wasyl**

Zakład Mikrobiologii

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy  
Instytut Badawczy

Puławy, 2014

## Autoreferat

---

I.	Imię i Nazwisko .....	2
II.	Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	2
III.	Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych .....	2
IV.	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.) .....	2
A.	Tytuł osiągnięcia naukowego .....	2
B.	Lista publikacji tworzących cykl jednotematyczny.....	2
V.	Omówienie celu naukowego pracy i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania .....	3
1.	Wstęp .....	3
2.	Częstość występowania oporności <i>Salmonella</i> spp. i <i>Escherichia coli</i> .....	5
3.	Charakterystyka mechanizmów oporności na cefalosporyny .....	7
4.	Charakterystyka mechanizmów oporności na chinolony.....	10
5.	Wnioski .....	13
VI.	Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych.....	14
A.	Działalność naukowo – badawcza .....	14
1.	Metody wykrywania i identyfikacji <i>Salmonella</i> spp. ....	14
2.	Epidemiologia zakażeń <i>Salmonella</i> spp.....	14
3.	Projekty badawcze .....	15
B.	Działalność referencyjna i ekspercka .....	16
1.	Krajowe Laboratoria Referencyjne .....	16
2.	Międzynarodowe grupy eksperckie .....	17
3.	Międzynarodowe konsorcja badawcze .....	17
4.	Recenzje artykułów naukowych .....	17
C.	Działalność dydaktyczna .....	18
D.	Podnoszenie umiejętności i kwalifikacji .....	18
1.	Staże, szkolenia i kursy.....	18
2.	Nagrody naukowe i wyróżnienia .....	19
E.	Inna działalność .....	19
VII.	Sumaryczne zestawienie dorobku naukowego.....	20
VIII.	Piśmiennictwo .....	22

**I. Imię i Nazwisko****Dariusz Wasyl****II. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej**

- dyplom ukończenia studiów na kierunku medycyna weterynaryjna, Akademia Rolnicza (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy) w Lublinie, 1995, lekarz weterynarii
- dyplom doktora nauk weterynaryjnych, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach, 2003; tytuł rozprawy: Ocena technik typowania pałeczek *Salmonella enterica* stosowanych w badaniach epidemiologicznych salmonellozy świń

**III. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

- Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Mikrobiologii, od 1 lipca 1995 do chwili obecnej

**IV. Wskazanie osiągnięcia<sup>1</sup> 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.)**

A. Tytuł osiągnięcia naukowego

**Występowanie i charakterystyka mechanizmów oporności na cefalosporyny i chinolony u *Salmonella* spp. i *Escherichia coli***

B. Lista publikacji tworzących cykl jednotematyczny

Jednotematyczny cykl obejmuje siedem wymienionych poniżej publikacji, z których sześć zostało opublikowanych w czasopiśmie indeksowanym w Thomson Reuters Journal Citation Reports®. Ich sumaryczny współczynnik IF, aktualny dla roku opublikowania, wynosi 14,881 a łączna, aktualna dla roku opublikowania, liczba punktów MNiSW wynosi 156. Liczba cytowań tych prac wg Thomson Reuters Web of Knowledge® wynosi 26<sup>2</sup>.

W wymienionych poniżej publikacjach pełniłem rolę autora korespondencyjnego.

Lp.	autor/ autorzy	tytuł artykułu	wydawca	IF	MNiSW
[1]	Wasyl D, Hoszowski A, Zajac M, Szulowski K	Antimicrobial resistance in commensal <i>Escherichia coli</i> isolated from animals at slaughter	Front Microbiol <b>2013</b> ; 4: 1-12	3,941	10
[2]	Wasyl D, Hoszowski A, Zajac M, Skarzyńska M	Simple and efficient screening method for detection of cephalosporin resistant <i>Escherichia coli</i>	Bull Vet Inst Pulawy <b>2010</b> ; 54: 147-51	0,321	20

<sup>1</sup> w przypadku prac wspólnych przedstawiono oświadczenia współautorów, które stanowią załącznik do wniosku

<sup>2</sup> stan z dnia 2014-09-29

[3]	Wasył D, Hasman H, Cavaco LM, Aarestrup FM	Prevalence and characterization of cephalosporin resistance in nonpathogenic <i>Escherichia coli</i> from food-producing animals slaughtered in Poland*	Microb Drug Resist <b>2012</b> ; 18: 79-82	2,364	20
[4]	Wasył D, Hoszowski A	First isolation of ESBL-producing <i>Salmonella</i> and emergence of multiresistant <i>Salmonella</i> Kentucky in turkey in Poland*	Food Res Int <b>2012</b> ; 45: 958–61	3,005	40
[5]	Wasył D	Mechanizmy oporności <i>Salmonella</i> na chinolony <sup>3*</sup>	Medycyna Wet <b>2009</b> ; 65: 516-20	0	6
[6]	Wasył D, Hoszowski A, Zajac M	Prevalence and characterisation of quinolone resistance mechanisms in <i>Salmonella</i> spp	Vet Microbiol <b>2014</b> ; 171: 307-14	2,726	40
[7]	Wasył D	Prevalence and characterisation of quinolone resistance mechanisms in commensal <i>Escherichia coli</i> isolated from slaughter animals in Poland, 2009 – 2012	Microb Drug Resist, <b>2014</b> ; DOI: 10.1089/mdr.2014.0061	2,524	20
Razem				14,881	156

\* prace nagrodzone w konkursach na publikacje naukową

## V. Omówienie celu naukowego pracy i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

“It is not difficult to make microbes resistant (...)” Sir Alexander Fleming, Nobel Lecture, 11 grudnia, 1945

### 1. Wstęp

Substancje antybakteryjne, „magiczne” cząsteczki odkryte i zastosowane w praktyce mniej niż sto lat temu, zasadniczo zmieniły życie człowieka. Umożliwiły nie tylko leczenie i zapobieganie chorobom bakteryjnym człowieka i zwierząt, ale otworzyły też nowe możliwości w medycynie, takie jak przeszczepy narządów czy chemioterapia, które nie były możliwe w okresie przedantybiotykowym. Początkowy entuzjazm związany ze zwycięstwem nad patogenami bakteryjnymi szybko jednak zgasł, a teza wygłoszona przez Fleminga w trakcie przyjmowania Nagrody Nobla, dotycząca pojawienia się oporności wśród bakterii, stała się faktem wcześniej niż przypuszczano. Obserwowany w ostatnich dekadach drastyczny spadek skuteczności substancji antybakteryjnych rysuje realną wizję ery poantybiotykowej, w której zabraknie środków do leczenia zakażeń wywołanych przez wielooporne bakterie.

<sup>3</sup> artykuł przeglądowy

Aby w pełni zrozumieć problem oporności trzeba na działanie substancji antybakteryjnych spojrzeć z perspektywy ekologicznej. Antybiotyk oddziałuje na patogen, przeciwko któremu został użyty. Działa on równocześnie na wszystkie inne, wrażliwe bakterie znajdujące się w miejscu podania. Jeżeli więc jakaś komórka bakteryjna będzie oporna na jego działanie, to namnoży się ona i rozprzestrzeni w całej niszy ekologicznej, uwolnionej od flory konkurencyjnej w wyniku działania antybiotyku. Ten mechanizm selekcji i rozprzestrzeniania się oporności ma miejsce przy każdym użyciu antybiotyku, u ludzi i u zwierząt, właściwym i uzasadnionym, ale także przy nadużywaniu lub nieprawidłowym zastosowaniu tych substancji. Stosowanie substancji antybakteryjnych prowadzi do selekcji oporności wśród: (i) bakterii patogennych wywołujących chorobę u ludzi lub/i zwierząt, (ii) mikroorganizmów komensalnych występujących u leczonych pacjentów lub (iii) bakterii występujących w środowisku, do którego substancje czynne lub ich aktywne metabolity są uwalniane. W efekcie mechanizmy oporności wyselekcjonowane u bakterii niepatogennych mogą zostać horyzontalnie przeniesione do patogenów ludzi i zwierząt [8].

Zjawisko oporności nie pojawiło się po wprowadzeniu do lecznictwa substancji antybakteryjnych. Opublikowane ostatnio wyniki badań dowodzą, że zjawisko jest tak stare, jak same bakterie [9]. Skoro bakteria wykształcała mechanizmy produkcji czynników, które dawały jej przewagę w walce o zajmowaną niszę ekologiczną, to aby przetrwać musiała równocześnie stworzyć sposób ochrony przed własnym produktem. Oporność należy zatem uznać za zjawisko naturalne, ale przez powszechne stosowanie substancji antybakteryjnych wrażliwe bakterie są eliminowane i zastępowane populacją mikroorganizmów opornych.

Obecnie podejmuje się szereg działań mających ograniczyć zagrożenia wynikające z oporności bakterii. Podstawową zasadą jest rozważne stosowanie antybiotyków w leczeniu ludzi i zwierząt, zawsze poprzedzone badaniem antybiotykowrażliwości. W krajach UE zabroniono stosowania antybiotyków jako promotorów wzrostu zwierząt, a stosowanie niektórych substancji czynnych jest ograniczone wyłącznie do medycyny (np. karbapenemy). Stosowanie antybiotyków w weterynarii, związane głównie z leczeniem całych stad zwierząt hodowlanych, jest często negatywnie postrzegane przez opinię publiczną. Czasami takiemu stosowaniu substancji antybakteryjnych czynione są zarzuty o generowanie oporności, która zagraża zdrowiu publicznemu. Istotnie, oporność bakterii izolowanych od zwierząt bywa wysoka [1], a ograniczenie stosowania antybiotyków prowadzi zwykle do spadku częstości występowania oporności [10]. Relacje te są jednak skomplikowane i nie zawsze udaje się znaleźć dowody na bezpośrednie związki oporności bakterii pochodzących od zwierząt z opornością bakterii patogennych dla ludzi [8, 11]. Prowadzony w krajach UE monitoring oporności służy ocenie skali zjawiska i określaniu tych relacji [12].

Uznając problem oporności za ważny, Światowa Organizacja Zdrowia stworzyła klasyfikację substancji czynnych, która określa znaczenie poszczególnych klas antybiotyków w leczeniu człowieka [13]. Klasy zaliczone do krytycznie istotnych w ochronie zdrowia publicznego są (i) jedynym, lub jednym z nielicznych sposobów leczenia poważnych chorób człowieka a (ii) sam patogen lub geny oporności mogą być nabyte ze źródeł takich jak środowisko naturalne lub zwierzęta. Biorąc pod uwagę zakażenia ludzi bakteriami z rodziny Enterobacteriaceae, cefalosporyny i fluorochinolony zostały zaliczone do kategorii krytycznie istotnych w ochronie zdrowia publicznego.

W związku z powyższym, za cel prezentowanego osiągnięcia naukowego przyjęto charakterystykę mechanizmów oporności na cefalosporyny i chinolony u *Salmonella* spp. uzyskanych ze źródeł innych niż człowiek (zwierzęta, pasze, żywność) oraz u komensalnych *Escherichia (E.) coli* izolowanych w trakcie uboju zwierząt rzeźnych. Były to pierwsze prowadzone w skali całego kraju, systematyczne badania izolatów uzyskiwanych ze źródeł

weterynaryjnych, które miały rzucić światło na skomplikowany problem oporności na te klasy antybiotyków.

## 2. Częstość występowania oporności *Salmonella* spp. i *Escherichia coli*

Dane dotyczące oporności *Salmonella* spp. i komensalnych *E. coli* znacząco się różnią. W przypadku *Salmonella* odzwierciedlają one zwykle klonalne rozprzestrzenianie się patogenu. Prowadzone badania dotyczą najczęściej określonego serowaru *Salmonella* i fakt ten ma istotny wpływ na stwierdzany poziom oporności na antybiotyki czy też obserwowane profile oporności. Dane zbiorcze dotyczące rodzaju *Salmonella* pochodzą z programu monitorowania oporności prowadzonego w krajach UE [12, 14]. Wśród izolatów od ludzi stwierdzano głównie wysoką oporność na ampicylinę, sulfonamidy i tetracyklinę, a oporność na cefalosporyny i fluorochinolony występowała rzadko. Podobny poziom oporności obserwowano wśród izolatów od zwierząt, z tą różnicą, że izolaty te często cechowała oporność na fluorochinolony. Rozbieżność ta wynika jednak ze stosowania różnych kryteriów interpretacji: wartości granicznych (ang. breakpoints) używanych w medycynie w celu identyfikacji oporności klinicznej oraz używanych w weterynarii kryteriów epidemiologicznych, identyfikujących oporność mikrobiologiczną. U nielicznych izolatów pochodzących tak od ludzi, jak od zwierząt, notowano jednoczesną oporność na antybiotyki zaliczane do kategorii krytycznie istotnych. Co więcej, wysokie wartości MIC (Minimal Inhibitory Concentration) wskazują na występowanie oporności klinicznej na fluorochinolony w przypadku kilku serowarów o istotnym znaczeniu epidemiologicznym [14]. W Polsce wspomniany monitoring jest prowadzony w Krajowym Laboratorium Referencyjnym przez zespół badawczy, w którego skład wchodzi.

Ze względu na związki epidemiologiczne pomiędzy opornością i przynależnością serowarową, do cyklu monograficznego nie włączono publikacji na temat ogólnej oporności *Salmonella*. Zbiorcze wyniki zostały przedstawione w rozdziale monografii pt. „Oporność *Salmonella* i komensalnych *Escherichia coli* – skutek stosowania antybiotyków czy epidemiologia zakażeń?” [15]. Oporność na co najmniej jedną z badanych substancji czynnych odnotowano w 56,9% z 3795 izolatów badanych w latach 2008 – 2012. Największą oporność obserwowano w przypadku chinolonów (39,6% dla ciprofloksacyny i 36,0% dla kwasu nalidyksowego) i streptomycyny (25,8%). Kilkunastoprocentową oporność notowano w przypadku sulfametoksazolu (17,8%), tetracykliny (17,7%) i ampicyliny (16,7%), a kilkuprocentową (2,6% ÷ 4,1%) dla fenikoli, aminoglikozydów, trimetoprimu i kolistyny. Sporadycznie stwierdzano oporność *Salmonella* na cefalosporyny (0,4%). Wśród *Salmonella* (*S.*) Enteritidis i *S. Virchow* dominujące znaczenie miała oporność na chinolony, stwierdzana w zależności od serowaru, u ponad 40% i prawie 100% badanych izolatów. Wyniki dotyczące oporności poszczególnych serowarów były prezentowane w artykułach poświęconych epidemiologii *Salmonella* wymienionych w punkcie VI.A.2. Warto jednak zwrócić uwagę na kilka aspektów tego zagadnienia:

- wielooporność obejmującą wysoki poziom oporności na fluorochinolony *S. Kentucky* [4, 16, 17]. Jeden z artykułów dotyczących tego zagadnienia został włączony do cyklu tworzącego osiągnięcie naukowe [4],
- incydentalne występowanie oporności *S. Mbandaka* [18],
- spadek oporności *S. Typhimurium* wynikający z pojawienia się [19] i rozprzestrzeniania [20] jednofazowego wariantu zarazka.

Monitorowanie oporności patogenów bakteryjnych takich jak *Salmonella* spp. ma na celu odpowiednio wczesne reagowanie i przeciwdziałanie zakażeniom groźnym dla zdrowia i życia. Programy zwalczania *Salmonella* w stadach drobiu w krajach UE, poprawa warunków higienicznych oraz rosnąca świadomość społeczna w znacznym stopniu ograniczają

zagrożenie epidemiologiczne. Tym samym zmniejsza się ilość izolatów dostępnych do badań. Bakterie komensalne, takie jak *E. coli*, są w tej sytuacji dobrym alternatywnym obiektem badań. Chociaż znane są fenotypy patogenne, większość izolatów *E. coli* wchodzących w skład flory jelitowej człowieka lub zwierząt może być uznana za bakterie wskaźnikowe – komensale pozbawione cech chorobotwórczości [11], które można wykorzystać w monitorowaniu oporności na substancje antybakteryjne. Zaletą badania oporności komensali jest ich powszechne występowanie i stosunkowo proste i wydajne metody izolacji. Dodatkowo, w odróżnieniu od bakterii patogennych, właściwie wyklucza się wpływ klonalnego szerzenia się zakażeń na uzyskiwane wyniki. Jest jeszcze jeden efekt monitorowania oporności bakterii komensalnych – możliwość uzyskania wyników wskazujących na wielkość presji selekcyjnej wynikającej bezpośrednio ze stosowania antybiotyków w źródle izolacji tych bakterii np. u danego gatunku zwierząt [21, 22].

Należy tutaj podkreślić kluczowe znaczenie kryteriów interpretacji stosowanych w monitorowaniu oporności [14, 23]. Podejście epidemiologiczne jest właściwe w badaniach monitoringowych zarówno patogenów, jak i bakterii komensalnych. Daje możliwość nie tylko wczesnego wykrycia zmian oporności w populacji bakterii, ale również identyfikację nowych mechanizmów oporności. Kryteria kliniczne byłyby ponadto wysoce nieodpowiednie w badaniu niepatogennych komensali. Zharmonizowany i systematyczny monitoring umożliwi również ocenę tendencji dotyczących występowania oporności bakterii w czasie i może być dodatkowo uzupełniony analizą jakościową danych [23, 24].

Wymienione zalety monitorowania oporności bakterii komensalnych zostały wykorzystanie w badaniu przedstawionym w **pierwszej publikacji zaliczonej do prezentowanego osiągnięcia naukowego [1]**. Badania objęły ponad 3400 komensalnych *E. coli* wyizolowanych w ciągu 4 lat (2009 – 2012) od bydła, świń, indyków, broilerów i kur niosek. Badanie każdego roku obejmowało około 170 izolatów od każdego gatunku lub grupy produkcyjnej zwierząt. Umożliwiło to zarówno wykonanie porównania skali oporności komensalnych *E. coli* w zależności od poszczególnych źródeł izolacji, jak i ocenę trendów oporności na kilkanaście stosowanych substancji czynnych. Pobieranie próbek podczas uboju zwierząt pozwoliło uzyskać wyniki, które można odnieść do presji selekcyjnej antybiotyków stosowanych w całym okresie chowu. Uzyskane rezultaty są reprezentatywne dla całego kraju, gdyż próbki pochodziły z wielu rzeźni mających dominujący udział w krajowej produkcji wołowiny, wieprzowiny i różnych rodzajów mięsa drobiowego. Tym samym stwierdzone odsetki izolatów opornych odzwierciedlają narażenie konsumentów na oporne na antybiotyki bakterie pochodzenia zwierzęcego w Polsce. Najwyższe wartości (~40%) obserwowane w przypadku tetracykliny, ampicyliny i ciprofloksacyny, nie odbiegały znacznie od tendencji obserwowanych w innych krajach UE [14, 21]. Również oporność na cefalosporyny pozostawała na niskim poziomie, chociaż w niektórych krajach obserwowano ją zdecydowanie częściej [14]. Poziom występowania oporności znacznie się różnił w zależności od źródła izolacji: większość (79,9%) *E. coli* pochodzących od bydła nie wykazywała jakiegokolwiek oporności, podczas gdy cecha ta dotyczyła zaledwie 5,1% izolatów od brojlerów i 11,3% od indyków. Równocześnie oba te gatunki były źródłem izolacji większości izolatów wieloopornych (MDR – multi-drug resistant), o rozszerzonej oporności (XDR – extensively-drug resistant) oraz całkowicie opornych (PDR – pandrug resistant) na wszystkie badane antybiotyki (1,6% ÷ 1,9%). Obraz ten odzwierciedla różną konsumpcję oraz preferencje i praktyki stosowania antybiotyków w poszczególnych sektorach produkcji zwierzęcej. Dla przykładu, można przyjąć, że duża część bydła jest kierowana do uboju na skutek spadku produktywności mlecznej (średni wiek w chwili uboju: 48 miesięcy; maks. 214 miesięcy) i nie była wcześniej leczona antybiotykami, które powodowałyby konieczność zastosowania okresu karencji dla uzyskiwanego mleka. Zupełnie inaczej

wygląda sytuacja w przypadku brojlerów i indyków, którym mogą być podawane antybiotyki z zachowaniem jedynie kilkudniowego okresu karencji na mięso bezpośrednio przed ubojem. Prowadzi to do nagromadzenia odpornej flory jelitowej. Skutkiem rzadszego stosowania antybiotyków u kur niosek (karencja na jaja) oporność komensalnych *E. coli* jest o połowę niższa oporność izolatów od brojlerów, która nierzadko przekracza 80%. Różne profile oporności obserwowane u *E. coli* od bydła, świń i drobiu jednoznacznie wskazują na preferencje w stosowaniu określonych substancji czynnych u tych zwierząt.

Odpowiedź na pytanie, czy oporność notowana u bakterii odzwierzęcych znajduje odzwierciedlenie w łańcuchu pokarmowym i środowisku, wydaje się truizmem. Dowody na bezpośrednie związki pomiędzy zwierzętami i żywnością z nich pozyskiwaną znajdowano tak w Polsce, jak i innych krajach [21, 25]. Również ekspozycja środowiska na odporne bakterie pochodzące od zwierząt oraz antybiotyki stosowane w hodowli jest dobrze znana [22, 26]. Ostatnie badania, w których potwierdziliśmy obecność opornych komensalnych *E. coli* u zwierząt dzikich oraz wyższy poziom oporności u zwierząt żerujących w pobliżu siedzib ludzkich (dziki i sarny) w porównaniu z tymi żyjącymi w głębi lasu (jelenie i daniele) [27], uzasadniają postrzeganie oporności na antybiotyki jako złożonego zjawiska ekologicznego.

Oporność bakterii często określa się mianem rosnącego zagrożenia. Nie negując tej tezy, na podstawie uzyskanych wyników oznaczania oporności komensalnych *E. coli* [1] należy stwierdzić, że jest to zjawisko o wiele bardziej skomplikowane i zależne nie tylko od presji selekcyjnej i stosowania antybiotyków [22]. Analiza zmian oporności w czasie wykazała, że w większości przypadków jej poziom jest stabilny (np. chinolony). Zmiany oporności w czasie stwierdzono tylko w 16 z 65 analizowanych kombinacji substancji czynnej i źródła izolacji: odsetek izolatów opornych zmienił się w 9 przypadkach, w siedmiu pozostałych zmiana wyrażała się jedynie przesunięciem wartości MIC. Obniżenie wartości MIC stwierdzone w 4 przypadkach (tetracyklina/nioski, florfenikol/nioski, chloramfenikol/nioski i chloramfenikol/bydło) było zaskakujące i bezprecedensowe w nielicznej literaturze naukowej dotyczącej analiz ilościowych w ocenie oporności. Osiem z 12 przypadków narastania oporności dotyczyło antybiotyków  $\beta$ -laktamowych i cefalosporyn u bakterii izolowanych od drobiu i bydła. Dowodzi to dużej dynamiki zjawiska oporności na tą krytycznie istotną klasę antybiotyków i tym bardziej uzasadnia potrzebę szczegółowej charakterystyki mechanizmów oporności.

Powyższe zagadnienia związane z ogólnie pojętą opornością, stanowią podstawę szczegółowych badań wchodzących w skład zasadniczej części osiągnięcia naukowego. Badania te zostały przeprowadzone na ściśle określonych grupach izolatów wybranych z ponad 7000 *Salmonella* i *E. coli* objętych monitorowaniem oporności w latach 2008 – 2012.

### **3. Charakterystyka mechanizmów oporności na cefalosporyny**

Cefalosporyny są jednym z typów  $\beta$ -laktamów – największej i najbardziej zróżnicowanej grupy antybiotyków. Są one stosowane do leczenia niemal wszystkich rodzajów zakażeń o różnej etiologii. Ich mechanizm działania polega na wiązaniu z białkami PBP (penicillin-binding proteins), którego skutkiem jest zaburzenie syntezy ściany komórkowej prowadzące do śmierci bakterii. U bakterii Gram-ujemnych, spośród kilku znanych typów mechanizmów oporności, największe znaczenie ma wytwarzanie  $\beta$ -laktamaz – enzymów rozkładających substancję czynną.  $\beta$ -laktamazy, podobnie jak same  $\beta$ -laktamy, charakteryzuje duża różnorodność. Na podstawie sekwencji aminokwasowych i pokrewieństwa ewolucyjnego,  $\beta$ -laktamazy dzieli się na cztery tzw. klasy wg Ambler (A – D). Inna klasyfikacja, tzw. funkcjonalna wg Bush i Jacoby'ego, opiera się na szybkości reakcji hydrolizy różnych substratów oraz podatności enzymów na działanie inhibitorów. Wyróżnia się trzy zasadnicze grupy funkcjonalne, które dosyć dobrze korelują z klasami Ambler. Grupa 1, zwyczajowo



określana terminem „cefalosporynazy AmpC” to enzymy preferujące cefalosporyny, ale aktywne też w stosunku do penicylin i monobaktamów. Są słabo podatne na działanie kwasu klawulanowego, ale ich aktywność jest hamowana przez kloksacylinę. Druga grupa obejmuje liczne enzymy o bardzo różnym spektrum: penicylinazy, cefalosporynazy, oraz  $\beta$ -laktamazy o szerokim i rozszerzonym spektrum substratowym. Ich wspólną cechą jest podatność na inhibitory takie jak kwas klawulanowy, tazobaktam i sulbaktam. Są określane mianem ESBL (Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases –  $\beta$ -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym). Grupa 3 obejmuje metalo- $\beta$ -laktamazy (MBL) hydrolizujące penicyliny, cefalosporyny i karbapenemy. Enzymy te nie są hamowane przez inhibitory  $\beta$ -laktamaz, ale są blokowane przez EDTA [28, 29].

Historia odkryć kolejnych enzymów jest ściśle skorelowana z wprowadzaniem do leczenia nowych  $\beta$ -laktamów: penicylinazy poznano w latach 50-tych i 60-tych XX wieku, a cefalosporynazy w 70-tych i 80-tych. Następnie trwała ewolucja tych enzymów polegająca na poszerzaniu spektrum substratowego, aż do obecnie obserwowanej epidemii karbapenemaz [11, 28].

Większość bakterii Gram-ujemnych posiada typowe dla gatunku  $\beta$ -laktamazy, których geny zlokalizowane są w chromosomalnym DNA. Enzymy te charakteryzują się szerokim zakresem preferencji substratowych. Przykładem jest występująca u *E. coli* cefalosporynaza AmpC, produkowana na zbyt niskim poziomie aby powodować oporność kliniczną bakterii. Oporność taka występuje dopiero w przypadku wystąpienia zjawisk genetycznych np. mutacji w obrębie genów regulatorowych, które prowadzą do nadekspresji genu i hyperprodukcji enzymu.  $\beta$ -laktamazy chromosomalne mają ograniczone znaczenie dla szerzenia się oporności. Zagrożenie stwarzają głównie  $\beta$ -laktamazy kodowane na plazmidach, których powstanie łączy się z mobilizacją genów chromosomalnych (np. *bla*<sub>CMY-2</sub> pochodzący od *ampC Citrobacter freundii*). Geny kodujące nabyte  $\beta$ -laktamazy, zarówno ESBL, AmpC, jak i MBL, są najczęściej zlokalizowane na plazmidach koniugacyjnych o szerokim spektrum gospodarza, przez co szybko się rozprzestrzeniają również pomiędzy bakteriami reprezentującymi różne gatunki i grupy taksonomiczne. Dodatkowo występują one często w obrębie elementów genetycznych takich jak transpozony i integrony, które umożliwiają im przenoszenie pomiędzy różnymi cząsteczkami DNA. Chociaż zarówno ESBL, jak i AmpC są równie groźne z klinicznego punktu widzenia, to ze względu na częstość wywoływania zakażeń u ludzi większe znaczenie epidemiologiczne (zakażenia szpitalne) zdają się mieć ESBL występujące głównie u Enterobacteriaceae (np. *Klebsiella* spp.) oraz pałeczek niefermentujących (np. *Pseudomonas aeruginosa*). Najgroźniejsze klinicznie karbapenemazy, generujące oporność na leki „ostatniej szansy” w Polsce notowane są stosunkowo rzadko. Są one również przenoszone na plazmidach, ale ze względu na niską wydajność koniugacji, klonalne szerzenie się opornego zarazka jest głównym sposobem rozprzestrzeniania oporności. W ostatnich latach najwięcej uwagi poświęcano karbapenemazom KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) oraz NDM-1 (New Dehli metallo- $\beta$ -lactamase) [28, 29].

Literatura naukowa dostarcza wielu danych na temat zakażeń ludzi bakteriami opornymi na cefalosporyny – są to głównie opisy zakażeń szpitalnych. Mniej wiadomo o skali nosicielstwa takich bakterii w populacji ludzi zdrowych [29, 30]. U zwierząt sytuacja jest odwrotna: dysponujemy nielicznymi danymi uzyskiwanymi z przypadków klinicznych, dotyczących głównie zwierząt towarzyszących, i wieloma informacjami pochodzącymi z programów monitorowania oporności u bakterii pochodzących od klinicznie zdrowych zwierząt [11, 22, 31]. Badania przedstawione w artykułach nr [2] i [3] wchodzących w skład prezentowanego osiągnięcia wpisują się w takie właśnie dane monitoringowe.

**W artykule opublikowanym w 2010 r. [2]** wraz ze współautorami skupiliśmy się na metodach izolacji komensalnych *E. coli* opornych na cefalosporyny oraz na identyfikacji

fenotypowej cefalosporynaz. W odróżnieniu od przypadków klinicznych, w których czynnik chorobotwórczy dominuje w badanej próbce, bakterie odporne na cefalosporyny stanowią tylko drobny fragment flory bakteryjnej kolonizującej zwierzęta klinicznie zdrowe. Zaproponowana prosta i wydajna metoda pozwoliła na znaczącą poprawę częstości wykrywania *E. coli* opornych na cefalosporyny. Mechanizm oporności był następnie zidentyfikowany przy użyciu testów fenotypowych (E-test®) wykorzystujących przedstawione wcześniej zasady hamowania aktywności cefalosporynaz. Taki sposób postępowania jest wystarczający do prawidłowego różnicowania oporności na cefalosporyny dla celów terapeutycznych. Wnioskiem o znaczeniu epidemiologicznym było potwierdzenie, że drób i świnie są często (brojlery – 54,5%; nioski – 42,3%; indyki – 48,0%; świnie – 33,3%) skolonizowane przez odporne na cefalosporyny *E. coli* produkujące zarówno ESBL jak i AmpC. Nie stwierdzono natomiast występowania takich bakterii u bydła. Również żaden z izolatów od zwierząt nie był też odporny na karbapenemy. Podobne rezultaty uzyskano w badaniach wykonanych w 2012 r., jednak częstość występowania *E. coli* opornych na cefalosporyny u poszczególnych gatunków zwierząt była nieco niższa i sięgała maksymalnie 36,6% u indyków [32].

Analiza mechanizmów oporności na cefalosporyny występujących u komensalnych *E. coli* stanowi kluczowe zagadnienie zaprezentowane w **trzecim artykule prezentowanego cyklu [3]**. Cefalosporynazy AmpC były produkowane dwukrotnie częściej niż  $\beta$ -laktamazy ESBL. Za ich produkcję odpowiedzialny był wyłącznie jeden gen kodowany na DNA plazmidowym – *bla<sub>CMY-2</sub>*, któremu czasami towarzyszyła nadekspresja chromosomalnego genu *ampC*. Analiza sekwencji regionu promotora *ampC* wykazała różne warianty obejmujące blisko 10 mutacji skutkujących nadprodukcją enzymu. Wytwarzanie  $\beta$ -laktamaz ESBL wynikało z obecności genów *bla<sub>CTX-M-1</sub>* oraz *bla<sub>SHV-12</sub>* (pojedynczy izolat od indyków). Genowi *bla<sub>CTX-M-1</sub>* towarzyszył często *bla<sub>TEM-1b</sub>*, który koduje penicylinazę nie powodującą oporności na cefalosporyny. Zarówno wspomniane mutacje, jak i obecność *bla<sub>TEM-1b</sub>* dowodzą, że oporność na cefalosporyny jest wynikiem wielu niezależnych zdarzeń genetycznych i epidemiologicznych zachodzących pod wpływem presji selekcyjnej. To, co odróżnia osiągnięte wyniki od większości innych jest fakt dominacji izolatów produkujących cefalosporynazy AmpC nad *E. coli* produkującymi ESBL oraz mała różnorodność stwierdzonych genów oporności na cefalosporyny, pomimo że izolaty pochodziły od zwierząt z terenu całego kraju oraz importowanych i uzyskano je w odstępie kilku miesięcy. Warto też podkreślić, że zidentyfikowane geny są odmienne niż większość obserwowanych w przypadkach zakażeń człowieka w Polsce [33]. Co ciekawe, u zwierząt dzikich – chociaż częstość występowania komensalnych *E. coli* opornych na cefalosporyny nie przekraczała 2% – w większości stwierdziliśmy te same geny co u zwierząt hodowlanych: głównie *bla<sub>CMY-2</sub>*, rzadziej *bla<sub>CTX-M-1</sub>* oraz w jednym przypadku *bla<sub>CTX-M-15</sub>*, a blisko połowę opornych izolatów produkujących zarówno cefalosporynazę CMY-2, jak i  $\beta$ -laktamazę CTX-M-1 uzyskano od dzików pochodzących z tego samego nadleśnictwa [27].

Zgoła odmienny obraz oporności na cefalosporyny obserwuje się u *Salmonella* spp. [15]. Oporność wynikająca z produkcji cefalosporynazy CMY-2 była notowana w przypadku pojedynczych izolatów reprezentujących różne serowary (Mbandaka, Putten, Enteritidis, Bredeney, Senftenberg; dane niepublikowane). Gen *bla<sub>CMY-2</sub>* zlokalizowany prawdopodobnie na unikatowym plazmidzie o wielkości ok. 140 kb został zidentyfikowany u jednego z izolatów *S. Mbandaka* charakteryzujących się nierozróżnialnym profilem PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) chromosomalnego DNA. Wszystkie te izolaty należały do typu sekwencyjnego MLST (Multilocus sequence type) ST413, który od kilkunastu lat szerzy się w Polsce [18]. Pierwszy, i jak dotąd jedyny przypadek *Salmonella* produkującego  $\beta$ -laktamazę ESBL wśród izolatów pochodzących od zwierząt, żywności i pasz został opisany w obrębie

klonu *S. Kentucky* ST198. Jednym z zagadnień prezentowanych w **czwartym artykule cyklu [4]** jest opis przypadku zakażenia *S. Kentucky* na fermie indyków, z którego wyizolowano ten wielooporny patogen produkujący  $\beta$ -laktamazę CTX-M. W dalszych badaniach zidentyfikowano gen *bla*<sub>CTX-M-25</sub> położony na koniugacyjnym plazmidzie IncA/C o wielkości około 168 kb. Sekwencjonowanie całego plazmidu wykazało nową strukturę kaset genowych – *aacA4*, *aacC-A1* oraz integron z genem *bla*<sub>OXA-21</sub> kodującym kolejną  $\beta$ -laktamazę. Niektóre z zaobserwowanych struktur genetycznych mogły być skutkiem transferu genów pomiędzy różnymi gatunkami bakterii. Nowatorski aspekt tej obserwacji wynika z faktu, że jest to pierwszy w Polsce przypadek wykrycia rzadko występującej  $\beta$ -laktamazy CTX-M-25. Kodujący ją gen nie był dotąd stwierdzany tak u *S. Kentucky* na całym świecie, jak i na plazmidzie z rodziny IncA/C występującym u jakiegokolwiek innej bakterii. Sekwencja plazmidu została zdeponowana w GenBank pod numerem KF056330 (Wasył D., Kern-Zdanowicz I., Domańska-Blicharz D., Zajac M., Hoszowski A., dane niepublikowane). Opisane przypadki, zarówno produkujący cefalosporynazę CMY-2 *S. Mbandaka*, jak i  $\beta$ -laktamazę *S. Kentucky*, jednoznacznie dowodzą transferu plazmidów zawierających geny oporności na cefalosporyny od innych bakterii obecnych w środowisku, jakimi są np. komensalne *E. coli* [11].

#### 4. Charakterystyka mechanizmów oporności na chinolony

Entuzjazm towarzyszący zastosowaniu chinolonów w leczeniu wynikał z nadziei, że bakterie nie będą w stanie wygenerować oporności na niewystępujące w przyrodzie, w pełni syntetyczne substancje. Małe dawki i korzystna farmakokinetyka spowodowały, że fluorochinolony zaczęto powszechnie stosować w medycynie i weterynarii. W związku z wydalaniem fluorochinolonów w postaci czynnej, ich działanie nie ogranicza się do miejsca podania, ale obejmuje również środowisko powodując presję selekcyjną na bytujące tam bakterie. Cechy te współgrając z kumulatywnym charakterem oporności, prowadzą do namnażania a następnie rozprzestrzeniania bakterii opornych na chinolony. W efekcie, po 50 latach stosowania chinolonów, obserwujemy dramatyczny spadek ich skuteczności. Zmiana postrzegania zagadnienia racjonalnego stosowania chinolonów wynika również z odkrycia różnorodnych mechanizmów oporności [34, 35]. Świadomość tych kwestii w pełni uzasadnia uznanie fluorochinolonów za krytycznie istotne dla zdrowia człowieka.

Mechanizmy działania antybakteryjnego chinolonów (hamowanie aktywności topoizomeraz bakteryjnych) oraz mechanizmy oporności na tą klasę substancji antybakteryjnych przedstawiłem w **piątym artykule tworzącym prezentowany cykl [5]**. Podstawowy mechanizm oporności jest skutkiem mutacji chromosomalnych w obrębie regionu QRDR (quinolone resistance determining region) genów kodujących podjednostki topoizomerazy II (gyraza; *gyrA*, *gyrB*) i IV (*parC* i *parE*). Na podkreślenie zasługuje kumulatywny charakter nabywania oporności: mutacje są spontaniczne i losowe, ale utrwalają się w populacji bakterii w wyniku presji selekcyjnej chinolonów obecnych w niszy ekologicznej. Kolejno odkrywane w ciągu ostatnich 20 lat mechanizmy oporności kodowane na plazmidach (PMQR – plasmid-mediated quinolone resistance; <http://www.lahey.org/qnrStudies/>) mogą w różny sposób wpływać na skuteczność chinolonów. Jest to związane z obecnością: 1) genów kodujących białka Qnr, które chronią topoizomerazy przed działaniem chinolonów; 2) pomp aktywnie usuwających substancje antybakteryjne poza struktury komórki bakteryjnej (np. QepA); 3) enzymów inaktywujących chinolony jak np. AAC(6')-Ib-cr. Wspólną cechą mechanizmów PMQR jest możliwość ich przenoszenia – geny, wraz z zawierającymi je plazmidami, mogą rozpowszechniać się w obrębie tej samej generacji bakterii, ale także pomiędzy populacjami bakterii reprezentującymi odległe grupy taksonomiczne. Artykuł [5] prezentuje również ogólne kryteria i metody stosowane do identyfikacji mechanizmów oporności występujących u *Salmonella* spp. i *Escherichia coli*. Na zakończenie sformułowano szereg pytań badawczych

i zidentyfikowano obszary wymagające dalszych badań. Część odpowiedzi miały dostarczyć badania opisane w dwóch ostatnich artykułach cyklu.

Charakterystyka mechanizmów oporności na chinolony występujących u *Salmonella* spp. [6] i komensalnych *E. coli* [7] jest tematem **dwóch publikacji zamykających cykl**. Zgodnie z moją wiedzą są to pierwsze tak szerokie i szczegółowe badania dotyczące oporności na tę klasę antybiotyków w Polsce, które objęły zarówno aspekt epidemiologiczny, jaki i kliniczny. Badania dotyczyły starannie wyselekcjonowanej grupy reprezentatywnych izolatów obu gatunków bakterii podejrzanych o występowanie mechanizmów związanych z mutacjami QRDR oraz PMQR. W grupie QRDR izolatów *Salmonella* spp. stwierdzono występowanie kilku mutacji w regionie QRDR genów *gyrA* (substytucje: Ser83; N = 22; →Leu, →Phe, →Tyr; Asp87; N = 22; →Asn, →Gly, →Tyr) i *parC* (Thr57→Ser; N = 23; Ala141→Ser; N = 1). Pozwoliły one wyróżnić 12 wzorców obejmujących jedną lub dwie mutacje. Nie stwierdzono jednak związku poszczególnych mutacji tak z serowarami, jak i z żadną z wartości MIC dla ciprofloksacyny. Mutacje tych samych genów zaobserwowano w przypadku *E. coli*. W obrębie podjednostki GyrA odnotowano substytucje Ser83→Leu (N = 44), Asp87 (N = 30), a w ParC zamianie ulegały aminokwasy w pozycjach Ala56→Thr (N = 1) i Ser80 (N = 28; →Arg, →Ile). Głównie za sprawą zmian w pozycji Asp87 (→Asn, →Gly, →Tyr, →Glu) podjednostki GyrA, odnotowałem 14 profili charakteryzujących się nawet 4 różnymi substytucjami. Warto zauważyć, że w przypadku kilku badanych izolatów *Salmonella* i *E. coli* wykazujących oporność mikrobiologiczną na ciprofloksacynę nie udało się zidentyfikować mechanizmów oporności. Może to wskazywać na obecność mechanizmów nie objętych badaniami, lub nawet dotychczas niezidentyfikowanych. Tak duża różnorodność substytucji w podjednostkach gyrazy i topoizomerazy IV dowodzi, że powstały one w wyniku mutacji punktowych, które zostały utrwalone w szczepach bakteryjnych w warunkach presji selekcyjnej. O losowym charakterze tego zdarzenia świadczą zarówno opisane w publikacjach mutacje synonimiczne, prowadzące do substytucji tym samym aminokwasem (np. ParC Ser80→Ile; [7]) jak również liczne mutacje ciche, dotyczące kodonów nie skutkujących zmianą oporności na chinolony. Te ostatnie mutacje można analizować sięgając do sekwencji zdeponowanych w GenBank (Accession Nos podano w publikacjach [6, 7]).

Podobieństwa *Salmonella* spp. i *E. coli* występują również w przypadku mechanizmów PMQR. Co prawda izolaty wykazujące ten fenotyp obserwowano częściej ( $p \leq 0,001$ ) w przypadku *E. coli* (6,2%, CI 95% 5,4 ÷ 7,0%) niż *Salmonella* spp. (3,4%, CI95% 2,7% ÷ 4,1%) to jednak w obu przypadkach stwierdzano wyłącznie geny kodujące białka Qnr. Najczęściej występował gen *qnrS1* (50 izolatów *Salmonella* oraz 70 *E. coli*) oraz *qnrB19* (24 *Salmonella* i 19 *E. coli*). Fakt ten można uznać za dowód nabywania tych determinant przez patogeny (np. *Salmonella*) ze źródeł środowiskowych takich jak flora niepatogenna [6, 7, 27, 36]. Ponadto, w pojedynczych przypadkach obserwowano gen *qnrS2* (*Salmonella*) i *qnrB17* (*E. coli*). Nie odnotowano natomiast występowania żadnej z pozostałych badanych determinant oporności PMQR tj.: *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qepA*, *aac(6')-Ib-cr*.

Warto podkreślić, że dwa izolaty *Salmonella* spp. oraz 7 *E. coli* z chromosomalnie kodowaną opornością równocześnie posiadały geny PMQR. Występowanie determinant PMQR z tą samą częstością u *E. coli* charakteryzujących się zarówno obecnością mutacji chromosomalnych regionu QRDR oraz ich brakiem wskazuje, że oba mechanizmy szerzą się niezależnie od siebie i obecność jednego mechanizmu nie zabezpiecza bakterii przed nabyciem drugiego.

Izolaty *Salmonella* spp. charakteryzujące się opornością typu PMQR reprezentowały 11 serowarów [6]. Przedstawiciele sześciu serowarów posiadały *qnrS1* a w przypadku pięciu serowarów obserwowano *qnrB19*. O związkach mechanizmów oporności na chinolony,

szczególnie PMQR, z przynależnością serowarową *Salmonella* świadczy fakt, że aż 55,3% izolatów *Salmonella* podejrzanych o obecność mechanizmów PMQR należała do *S. Newport* oraz sięgająca 41,3% częstość występowania determinant *qnr* wśród izolatów tego serowaru. Wnioski dotyczące występowania różnych mechanizmów oporności na chinolony oraz charakterystyka epidemiologiczna izolatów (PFGE) pozwoliły sformułować tezę dotyczącą różnych scenariuszy jej szerzenia się wśród *Salmonella* spp. Intrygujący przykład *S. Newport*, którego izolaty charakteryzuje niski stopień pokrewieństwa genetycznego oraz zróżnicowane mechanizmy oporności na chinolony (tak mutacje QRDR jak i geny *qnr*) dowodzi, że poszczególne kłony tego serowaru wykazują tendencje do gromadzenia determinant oporności w przebiegu niezależnych od siebie zakażeń. Wyjaśnienie przyczyn tego zjawiska wymaga przeprowadzenia dalszych badań [37]. Stwierdzone w przypadku *S. Enteritidis* liczne mechanizmy oporności wśród spokrewnionych izolatów świadczą o presji selekcyjnej chinolonów występującej w trakcie długotrwałego zakażenia tym zarazkiem. Tezę tę potwierdza dwudziestoprocentowy wzrost odsetka opornych izolatów *S. Enteritidis* uzyskiwanych od brojlerów zaobserwowany pomiędzy rokiem 2008 (36%) a 2009 (59%). W tym samym okresie oporność izolatów od kur niosek pozostała bez zmian [15]. Pojedyncze przypadki stwierdzenia *qnr* u *S. Saintpaul* i *S. Mbandaka* mają charakter incydentalny, związany prawdopodobnie z transferem plazmidu od innych bakterii. Nierozróżnialne profile DNA chromosomalnego izolatów *S. Infantis* i *S. Stanley* [38] wykazujących identyczne mechanizmy oporności świadczą o zakażeniach wywołanych przez odporne na chinolony kłony tych patogenów. Podobny przykład stanowi epidemiczne szerzenie się zakażeń *S. Kentucky* [16].

W pracy poświęconej *Salmonella* [6] nie omówiono mechanizmów oporności *S. Kentucky*. Jak już wspomniano, klon ST198 tego serowaru charakteryzuje wysoki, klinicznie istotny poziom oporności na fluorochinolony (wartości MIC dla ciprofloksacyny  $\geq 8$  mg/L, przy klinicznym kryterium interpretacji  $R > 1$  mg/L). Oporność taką, połączoną z wieloopornością wykazywały wszystkie izolaty pochodzące od zwierząt, z wyjątkiem izolatów od części gadów i z pasz [4, 17]. Przeprowadzone analizy (Wasył D., Kern-Zdanowicz I., Domańska-Blicharz D., Zajac M., Hoszowski A., dane niepublikowane; GenBank Accession Nos.: KC172109 ÷ KC172189) wykazały, że oporność ta jest skutkiem substytucji trzech aminokwasów w pozycjach Ser83→Phe i Asp87→Tyr podjednostki GyrA oraz Ser80→Ile w ParC. Taka kombinacja mutacji występuje niezmiernie rzadko i zgodnie z moją wiedzą dotyczy wyłącznie *S. Kentucky*. Wariant klonu ST198 występujący w Polsce zdaje się pochodzić z Afryki wschodniej [39]. Inna stwierdzona substytucja (ParC Tyr57→Ser) nie ma związku z opornością na chinolony [6] i wynika z występowania u *Salmonella* SNP (single nucleotide polymorphism) [40]. Warto dodać, że począwszy od 2009 r. [4] Krajowe Laboratorium Referencyjne Salmonellozy otrzymuje rocznie kilkadziesiąt izolatów *S. Kentucky* o takim profilu oporności, podczas gdy kliniczna oporność na chinolony u innych serowarów *Salmonella* występuje incydentalnie [6].

O wiele mniej wniosków epidemiologicznych można było wyciągnąć w przypadku badań komensalnych *E. coli* [7]. Należy jednak podkreślić różną częstość występowania genów PMQR wśród izolatów pochodzących od różnych gatunków zwierząt. Wahala się ona od 1,1% w przypadku bydła do 9,7% u indyków [7], co można wiązać z różną intensywnością stosowania chinolonów w chowie tych zwierząt [1]. Chociaż często mówi się o związkach pomiędzy opornością na chinolony (PMQR) i cefalosporyny [41], w przeprowadzonych badaniach nie znalazłem potwierdzenia tej tezy [6, 7]. Na zakończenie należy stwierdzić, że pomimo dużej jednorodności stwierdzonych genów *qnr*, która może wynikać z pochodzenia geograficznego izolatów, stwierdzony odsetek *Salmonella* spp. i *E. coli* posiadających te

determinanty wskazuje, że Polska należy do krajów o wysokiej częstości występowania PMQR [41].

### 5. Wnioski

Zaprezentowany jednotematyczny cykl publikacji stanowi pierwszą w Polsce kompleksową i systematyczną analizę dotyczącą występowania oporności na cefalosporyny i chinolony u *Salmonella* spp. i *E. coli* pochodzących od zwierząt. Uzyskane dane dotyczące oporności na te krytycznie istotne substancje antybakteryjne pozwalają na sformułowanie wniosków istotnych z punktu widzenia ekologii i epidemiologii oporności oraz zagrożeń zdrowia człowieka i zwierząt.

1. Nabywanie przez *Salmonella* spp. i *E. coli* oporności na cefalosporyny i chinolony jest zjawiskiem ekologicznym. Stosowanie tych substancji nie generuje oporności – skutkuje jedynie selekcją bakterii opornych, naturalnie występujących w ekosystemie. Presja selekcyjna, poprzez eliminację wrażliwej flory konkurencyjnej, prowadzi do zasiedlenia niszy ekologicznej bakteriami opornymi na te substancje.
2. Zagrożenie epidemiologiczne może wynikać z klonalnego szerzenia się opornych patogenów takich jak *Salmonella* spp. lub, jak głównie w przypadku komensalnych *E. coli*, być skutkiem transferu kodowanych na plazmidach genów oporności na cefalosporyny i chinolony. Plazmidy te mogą jednocześnie przenosić inne determinanty wpływające potencjalnie na przebieg zakażenia ludzi i zwierząt. Różne scenariusze nabywania oporności na chinolony przez *Salmonella* spp. świadczą, że rozprzestrzenianie się determinant oporności ma charakter złożony i wieloczynnikowy, który nie jest związany wyłącznie ze stosowaniem antybiotyków w chowie zwierząt. Poziom oporności na poszczególne antybiotyki (w tym chinolony) wykazuje dużą stabilność, a obserwowane zmiany oporności w czasie dotyczą tak wzrostu oporności (głównie na cefalosporyny), jak i jej spadku. Niezależnie od podejmowanych działań ukierunkowanych na ochronę krytycznie istotnych antybiotyków, import zwierząt i produktów może być źródłem bakterii opornych i genów oporności.
3. Bakterie odzwierzęce stanowią rezerwar genów oporności na cefalosporyny i chinolony, które mogą mieć wpływ na przebieg zakażeń i zdrowie człowieka. Uzyskane wyniki nie potwierdziły jednak bezpośredniego związku oporności bakterii izolowanych od zwierząt z mechanizmami oporności obserwowanymi u bakterii odpowiedzialnych za zakażenia człowieka. Dlatego, przynajmniej do czasu przeprowadzenia szczegółowych badań, wpływ taki można uznać za ograniczony.
4. Oporne na cefalosporyny lub/i chinolony *Salmonella* spp. i *E. coli* nie stanowią istotnego problemu klinicznego u zwierząt. Nie można jednak wykluczyć, że w określonych warunkach (np. spadek odporności) może dojść do wystąpienia objawów klinicznych salmonellozy lub transferu genów oporności do innych bakterii patogennych, czego skutkiem może być niepowodzenie terapeutyczne.

Ponadto, zidentyfikowano kilka obszarów wymagających dalszych badań dotyczących np.

- oceny rzeczywistego wpływu oporności na cefalosporyny i chinolony bakterii odzwierzęcych na zdrowie publiczne,
- identyfikacji dotychczas nieokreślonych mechanizmów oporności na chinolony,
- analizy przyczyn akumulacji różnych determinant oporności przez *S. Newport*,
- charakterystyki plazmidów przenoszących determinanty oporności na cefalosporyny i chinolony oraz poszukiwania metod ograniczania ich transferu i rozprzestrzeniania.

## VI. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

### A. Działalność naukowo – badawcza

#### 1. Metody wykrywania i identyfikacji *Salmonella* spp.

Na początku pracy zawodowej w PIWet-PIB moje zainteresowania badawcze koncentrowały się na metodach wykrywania i różnicowania *Salmonella*. Przykładem badań realizowanych przed obroną pracy doktorskiej są wyniki dotyczące typowania fagowego *Salmonella*, opublikowane w Medycynie Weterynaryjnej [42, 43]. Zainteresowania te były rozwijane w ramach grantu finansowanego przez Komitet Badań Naukowych [44]. Wynikiem prowadzonych badań była w 2003 r. obrona pracy doktorskiej poświęconej ocenie technik typowania epidemiologicznego stosowanych w badaniach epidemiologicznych salmonelozji świń. Zdobyta wiedza pozwoliła mi na aktywny udział w pracach wspomnianych poniżej eksperckich grup roboczych. W kolejnych latach uczestniczyłem we wdrażaniu znormalizowanych metod wykrywania *Salmonella* i oznaczania oporności na substancje antybakteryjne. Objęcie tego obszaru zakresem akredytacji było warunkiem powołania w Zakładzie Mikrobiologii krajowych laboratoriów referencyjnych. Kwestie metodologiczne pojawiały się również w prowadzonych do chwili obecnej badaniach i publikacjach zarówno przeglądowych [45, 46], jak i doświadczalnych, które dotyczyły np.:

- identyfikacji *Salmonella* o atypowych właściwościach biochemicznych [47],
- identyfikacji jednofazowych szczepów *S. Typhimurium* [48],
- identyfikacji nietypowych szczepów *Salmonella* z wykorzystaniem mikromacierzy [49],
- wykrywania *Salmonella* metodami alternatywnymi [50].

Doświadczenie zawodowe zespołu badawczego, w którego skład wchodzi, zaowocowało opracowaniem nowatorskiej pożywki do ekspresji antygenów rzęskowych *Salmonella* oraz jej wykorzystaniu do rewersji faz rzęskowych *Salmonella*. W 2012 r. oba wynalazki zostały zgłoszone do Urzędu Patentowego, a procedura patentowa jest w toku [51, 52].

#### 2. Epidemiologia zakażeń *Salmonella* spp.

Obok zagadnień diagnostycznych interesowałem się epidemiologią zakażeń *Salmonella*. Początkowo moje prace miały charakter przeglądowy lub były opisami przypadków izolacji *Salmonella* od zwierząt egzotycznych takich jak gady, papugi czy emu [53-55]. Również po doktoracie byłem współautorem artykułów o podobnej tematyce, chociaż dotyczyły one głównie zakażeń świń i drobiu [56-58] i roli pasz w cyklu krążenia *Salmonella* w przyrodzie [59, 60]. Badania epidemiologiczne, w których brałem udział, objęły różne serowary *Salmonella*:

- *S. Mbandaka*: Pierwszym zadaniem tego typu było opisanie *S. Mbandaka* – serowaru nieznanego w Polsce przed 1994 r [61]. Artykuł opublikowany w 2001 r. jest pierwszą charakterystyką molekularną tego serowaru [62] i do chwili obecnej był wielokrotnie cytowany. W ciągu następnych lat zakażenia *S. Mbandaka* nabrały znaczenia w wielu krajach europejskich [63]. Ostatnio, wraz ze współautorami wykazaliśmy, że niezaprzeczalny sukces epidemiologiczny *S. Mbandaka* jest związany z klonem ST413, który od blisko dwóch dekad szerzy się wśród ludzi i zwierząt [18].
- *S. Saintpaul*: Wykonane we współpracy międzynarodowej badania wykazały, że obserwowany w wielu krajach serowar *S. Saintpaul* szerzy się głównie w związku z subklinicznymi zakażeniami stad reprodukcyjnych indyków [64]. Skutkiem tego zakażeniu ulegają stada rzeźne, a poprzez żywność zarazek trafia do człowieka. Ubikwitalny charakter zarazka, wyrażający się różnymi źródłami izolacji i różnorodnymi

profilami DNA, powoduje, że wiele innych czynników, w tym także międzynarodowy handel i podróże mogą być czynnikiem ryzyka wpływającym na bezpieczeństwo konsumenta.

- *S. Typhimurium* i jednofazowe szczepy *S. Typhimurium*: Wraz ze współautorami cyklu publikacji opisywaliśmy zmiany zachodzące w epidemiologii *S. Typhimurium* występujących w Polsce. Przez dziesięciolecia różne klony tego serowaru pojawiały się i uzyskiwały znaczenie epidemiologiczne. Jeden z nich, *S. Typhimurium* DT104 notowany od początku lat 90-tych XX w. w krajach Europy Zachodniej, w Polsce został wyizolowany po raz pierwszy w 2000 r. Za źródło odpowiedzialne za wprowadzenie tego typu fagowego należy uznać importowane, bezobjawowo zakażone zwierzęta [65]. Kilka lat później, w 2008 r. po raz pierwszy od zwierząt w Polsce, na Białorusi i Ukrainie wyizolowano jednofazowe szczepy *S. Typhimurium*. Ten wariant serologiczny obecnie wydaje się zastępować i przerywać dominację wieloopornego klonu DT104 występującego często u zwierząt [19]. Głównym wektorem jednofazowych szczepów *S. Typhimurium* są świnie i wieprzowina, ale dotychczas jego znaczenie dla zdrowia publicznego jest ograniczone [20].
- *S. Kentucky*: Charakterystyka izolatów nowego w warunkach polskich serowaru *S. Kentucky* jest – obok opisu pierwszego przypadku izolacji szczepu *Salmonella* produkującego ESBL – głównym wynikiem pracy włączonej do jednotematycznego cyklu publikacji [4]. Kolejne badania potwierdziły, że klonalne rozprzestrzenianie się zarazka ma związek z ST198, zdecydowanie różnym od typowego dla gadów klonu ST314 [17]. Szczegółowe, molekularne badania epidemiologiczne obejmujące pochodzące od ludzi i zwierząt izolaty *S. Kentucky*, przeprowadzone w wielu współpracujących ośrodkach międzynarodowych, wykazały gwałtowne i globalne rozprzestrzenianie się klonu ST198, który jest notowany w rosnącej liczbie źródeł, w tym również w środowisku [16].

Charakterystyka epidemiologiczna wymienionych i innych serowarów *Salmonella* była również poruszana w innych publikacjach [47, 66] i licznych doniesieniach konferencyjnych.

### 3. Projekty badawcze

#### a) Aktualnie realizowane projekty badawcze

Aktualnie uczestniczę realizacji projektu badawczego 7 Programu Ramowego UE pt. „EFFORT – Ecology from farm to fork of microbial drug resistance and transmission”<sup>4</sup> (kierownik zadania badawczego realizowanego w PIWet-PIB w latach 2013 – 2018).

Kieruję również projektem finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki pt. „Inwazyjne gatunki zółwi jako źródło i wektor patogenów zwierząt i ludzi” (projekt nr 2013/11/B/NZ7/01690, 2014 – 2017).

W ramach realizowanego w latach 2014 – 2018 programu wieloletniego PIWet-PIB pt. „Ochrona zdrowia zwierząt i zdrowia publicznego”<sup>5</sup> kieruję zadaniem poświęconym oporności na substancje antybakteryjne *Salmonella* spp. i *E. coli* izolowanych od zwierząt. Uczestniczę też w zadaniu dotyczącym epidemiologii zakażeń *Salmonella* u zwierząt.

W badaniach statutowych PIWet-PIB kieruję tematem dotyczącym charakterystyki oporności na antybiotyki wybranych patogenów bakteryjnych zwierząt (2013 – 2014). Uczestniczę też

---

<sup>4</sup> Grant Agreement Number 613754; FP7 – Theme 2 KBBE.2013.1.3-05: Ecology of drug resistant bacteria and transfer of antimicrobial resistance throughout the food chain

<sup>5</sup> Uchwała Rady Ministrów nr 229/2013 z dnia 31 grudnia 2013 r. w sprawie ustanowienia programu wieloletniego „Ochrona zdrowia zwierząt i zdrowia publicznego” na lata 2014 – 2018



w badaniach dotyczących analizy czasowo-przestrzennej występowania zakażeń *Salmonella* u drobiu w Polsce (2014).

#### b) Zakończone projekty badawcze

W trakcie realizowanego w latach 2009 – 2013 programu wieloletniego PIWet-PIB pt. "Ochrona zdrowia zwierząt i zdrowia publicznego"<sup>6</sup> uczestniczyłem w realizacji 2 zadań badawczych: kierowałem tematem dotyczącym epidemiologii antybiotykooporności *Salmonella* spp. i *E. coli* oraz uczestniczyłem w badaniach nad epidemiologią zakażeń *Salmonella* w populacji zwierząt.

W trakcie realizowanego w latach 2004 – 2008 programu wieloletniego PIWet-PIB pt. "Ochrona zdrowia zwierząt i zdrowia publicznego"<sup>7</sup> byłem wykonawcą trzech zadań badawczych dotyczących epidemiologii *Salmonella* u zwierząt, środkach spożywczych oraz lekowrażliwości drobnoustrojów

Uczestniczyłem ponadto w realizacji kilku tematów statutowych realizowanych w PIWet-PIB w latach 1995 – 2008, a w latach 2000 – 2002 realizowałem promotorski projekt badawczy finansowany przez Komitet Badań Naukowych.

### B. Działalność referencyjna i ekspercka

#### 1. Krajowe Laboratoria Referencyjne

Jestem zaangażowany w działalność referencyjną realizowaną w Zakładzie Mikrobiologii:

a) Krajowe Laboratorium Referencyjne Salmonellozy powołane w 2004 r. Rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi<sup>8</sup>,

b) Krajowe Laboratorium Referencyjne Antybiotykooporności (*Salmonella* spp, *Escherichia coli* wskaźnikowa) powołane w 2008 r. Rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi<sup>9</sup>.

Uczestniczę w organizacji badań biegłości w zakresie izolacji i identyfikacji *Salmonella* w obszarze podstawowej produkcji zwierzęcej. Jestem współautorem 21 sprawozdań z programów badania biegłości zorganizowanych dla laboratoriów urzędowych w latach 2003 – 2013. Jako przedstawiciel laboratorium referencyjnego przeprowadzam wizyty kontrolne w weterynaryjnych laboratoriach urzędowych i laboratoriach prywatnych ubiegających się o zatwierdzenie przez Głównego Lekarza Weterynarii do wykonywania badań urzędowych w wymienionym zakresie.

W ramach prowadzonych działań z zakresu referencyjności brałem udział w badaniach podstawowych dotyczących występowania *Salmonella* u zwierząt rzeźnych, realizowanych we wszystkich Krajach Członkowskich UE w latach 2004 – 2008. Jestem współautorem sprawozdań krajowych, które zostały przekazane do Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności. Dane te zostały wykorzystane w sprawozdaniach Wspólnotowych opublikowanych w EFSA Journal (wymienione w punkcie III M załącznika d).

---

<sup>6</sup> Uchwała Rady Ministrów nr 244/2008 z dnia 28 października 2008 r. w sprawie ustanowienia programu wieloletniego „Ochrona zdrowia zwierząt i zdrowia publicznego” na lata 2009 – 2013

<sup>7</sup> Uchwała Rady Ministrów nr 173/2003 z dnia 8 lipca 2003 r. w sprawie ustanowienia programu wieloletniego „Ochrona zdrowia zwierząt i zdrowia publicznego” na lata 2003 – 2008

<sup>8</sup> Dz. U. 2004; Nr 251, poz. 2513

<sup>9</sup> Dz. U. 2008; Nr 118, poz. 757

Od 2014 r. nadzoruję badania laboratoryjne prowadzone w Krajowych Laboratoriach Referencyjnych Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w związku z Decyzją wykonawcą Komisji dotyczącą monitorowania oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe u bakterii zoonotycznych i komensalnych<sup>10</sup>.

## **2. Międzynarodowe grupy eksperckie**

Byłem powoływany w skład eksperckich grup roboczych Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności w zakresie raportowania zoonoz (2004 – 2005) oraz zharmonizowanego monitorowania oporności na antybiotyki u bakterii odzwierzęcych (2006-2008). Wyniki prac obu grup eksperckich były publikowane w postaci szeregu raportów<sup>11</sup>

Szczególne znaczenie ma raport poświęcony zharmonizowanemu monitoringowi oporności na czynniki antybakteryjne *Salmonella*<sup>12</sup>, który stał się podstawą pierwszego przepisu prawnego dotyczącego monitorowania oporności bakterii na antybiotyki w krajach UE<sup>13</sup>. Opracowane rekomendacje zostały zmodyfikowane w 2012 r.<sup>14,15</sup>.

W 2013 r. byłem członkiem grupy roboczej oceniającej perspektywy weterynaryjne Strategic Research Agenda. Joint Programming Initiative on Antimicrobial Resistance (<http://www.jpamr.eu>). Dokument ten stał się kluczowym elementem międzynarodowego konkursu „InnovaResistance: Innovative approaches to address antibacterial resistance”, ogłoszonego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w styczniu 2014 r.

## **3. Międzynarodowe konsorcja badawcze**

Jestem członkiem General Assembly (przedstawiciel PIWet-PIB) konsorcjum badawczego EFFORT – Ecology from Farm to Fork Of microbial drug Resistance and Transmission, (FP7, call: KBBE.2013.1.3-05: Ecology of drug resistant bacteria and transfer of antimicrobial resistance throughout the food chain).

Byłem członkiem Management Committee COST Action 920: Foodborne zoonosis: a coordinated food chain approach (2002 – 2006 oraz przedstawicielem partnera w konsorcjum ARBAO-II – Antibiotic resistance in bacteria of animal origin (FP5) (2002 – 2005).

## **4. Recenzje artykułów naukowych**

W okresie ostatnich trzech lat recenzowałem ponad 20 artykułów naukowych dla czasopism indeksowanych w Thomson Reuters Journal Citation Reports®. Szczegóły zostały podane w punkcie III P załącznika d).

---

<sup>10</sup> Instrukcja Głównego Lekarza Weterynarii nr GIWpuf-7200-36/2014 wdrażająca Decyzję wykonawczą Komisji Nr 2013/652/UE

<sup>11</sup> Needs to revise the Community Reports on Zoonoses and to harmonize data collection on zoonoses. The EFSA Journal (2005) 73, 1-60; Recommendations on starting the monitoring of Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in certain animal species, Note to EFSA's Advisory Forum 18.9.2007; Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection including a proposal for a harmonized monitoring scheme of antimicrobial resistance in *Salmonella* in fowl (*Gallus gallus*), turkeys and pigs and *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in broilers. The EFSA Journal (2007), 96, 1-46; Report from the Task Force on Zoonoses Data Collection including guidance for harmonized monitoring and reporting of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. from food animals. The EFSA Journal (2008), 141, 1-44.

<sup>12</sup> The EFSA Journal (2007), 96, 1-46

<sup>13</sup> O. J. EU, 2007. L 153: 26-29

<sup>14</sup> The EFSA Journal, 2012. 10(6), 2742, 1-64

<sup>15</sup> O. J. EU, 2013. L 303: 26-29

### C. Działalność dydaktyczna

Prowadzę szkolenia dla Inspekcji Weterynaryjnej i kursy dla pracowników laboratoriów diagnostycznych z zakresu diagnostyki i epidemiologii zakażeń *Salmonella* spp. oraz oporności na antybiotyki. Regularnie prezentuję aktualne problemy diagnostyczne i kwestie epidemiologiczne na dorocznych spotkaniach organizowanych przez laboratoria referencyjne Zakładu Mikrobiologii PIWet-PIB dla weterynaryjnych laboratoriów diagnostycznych wykonujących badania w obszarze regulowanym prawnie. Kilka razy prezentowałem podobne zagadnienia na warsztatach organizowanych przez laboratoria referencyjne UE dla krajowych laboratoriów referencyjnych. Przykłady takich wystąpień są dostępne pod adresem [www.crl-ar.eu/146-presentations.htm](http://www.crl-ar.eu/146-presentations.htm).

Jestem autorem artykułów opublikowanych w czasopismach popularno-naukowych i zawodowych takich jak *Życie Weterynaryjne* (n = 6), *World Poultry*, *Trzoda Chlewna*, *Roczniki Instytutu Przemysłu Mięsnego i Tłuszczowego*, *Pasze Przemysłowe* (n = 3), *NEWSLETTER to the National Reference Laboratories for Antimicrobial Resistance* (n = 3), *Magazyn Weterynaryjny* (n = 4), *Biuletyn Dolnośląskiej Izby Lekarsko-Weterynaryjnej*.

Prezentowałem wykłady na zaproszenie Federation of Veterinarians of Europe (Bruksela, 2011), Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków (Warszawa, 2007, 2013), Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów (Lublin, 2013), jak też na konferencji prasowej i spotkaniu z przedstawicielami przemysłu drobiarskiego, które były poświęcone bezpiecznemu stosowaniu antybiotyków w weterynarii (Warszawa, 2009, 2014).

Byłem promotorem pomocniczym pracy licencjackiej [32] obronionej z wyróżnieniem na Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie oraz jestem promotorem pomocniczym pracy magisterskiej, której obrona jest planowana w 2015 r. W obu przypadkach badania zostały lub są wykonywane w PIWet-PIB pod moim kierownictwem i dotyczą bakterii opornych na cefalosporyny występujących u zwierząt.

### D. Podnoszenie umiejętności i kwalifikacji

#### 1. Staże, szkolenia i kursy

Po obronie pracy doktorskiej obyłem szereg szkoleń i staży poszerzających moje umiejętności i kompetencje w zakresie epidemiologii chorób zakaźnych oraz antybiotykooporności:

- cykl szkoleń podyplomowych organizowanych przez European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases:
  - “Antimicrobial susceptibility testing and surveillance: from laboratory to clinic - the EUCAST and ESGARS Perspective (Hiszpania, Madryt, 2010, 4 dni),
  - “Quinolones: from bench to bedside” (Hiszpania, Santander, 2011, 3 dni),
  - “Carbapenemase-producing Gram-negative microorganisms: detection, epidemiology and therapeutic challenges” (Grecja, Ateny, 2011, 2 dni).
- cykl kursów organizowanych przez Światową Organizację Zdrowia:
  - WHO Global Salm-Surv International training course (Level 3): “Surveillance and Epidemiology of *Salmonella* and other foodborne diseases” (Warszawa, 2004, 5 dni),
  - Joint MedVetNet WHO Global Salm-Surv seminar on “Foodborne pathogens and diseases surveillance, detection, and response in new EU member states and Candidate countries” (Warszawa, 2006, 5 dni),
- szkolenie organizowane przez Institute for Turkey Diseases pt. “The 9<sup>th</sup> International Symposium on Turkey Diseases” (Niemcy, Berlin, 2012, 3 dni),

- szkolenia w ramach Phare 2003/005:
  - "Diagnosis methods in *Salmonella* spp. detection" (Włochy, Teramo, 2006, 14 dni),
  - "Databases in epidemiology" (Włochy, Teramo, 2006, 14 dni).
- szkolenie PulseNet Europe pt. „PFGE and image analysis training course” (UK, Londyn, 2006, 5 dni),
- staż w EURL-Antibiotic Resistance, DTU-Food pt. „Molecular detection of quinolone resistance and Extended spectrum cephalosporin resistance in Enterobacteriaceae” (Dania, Kopenhaga, 2009, 12 dni),
- szkolenie specjalistyczne w TREK Diagnostic Systems “SWIN Software Training” (UK, East Grinstead, 2004, 5 dni),
- szkolenie specjalistyczne w Applied Maths „Thirty seven international training workshop on the use of GelCompar II and BioNumerics (Belgia, Sint-Martens-Latem, 2006, 2 dni).

## 2. Nagrody naukowe i wyróżnienia

Uzyskałem doroczną nagrodę II stopnia Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych za rok 2012 za współautorstwo pracy opublikowanej w *Foodborne Pathogens and Disease* 2012, 9:1037-1043 (Warszawa, 2013). Kolejny artykuł mojego współautorstwa opublikowany w *Veterinary Microbiology* (2013, 166, 686–689), został wyróżniony w konkursie ogłoszonym przez Towarzystwo w 2014 r.

Kilkakrotnie uzyskiwałem nagrody Dyrektora w konkursie na najlepszą publikację pracowników naukowych Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w kategorii prac oryginalnych (2014, 2013, 2007, 1999) i przeglądowych (2010). Szczegóły podano w punkcie II J załącznika d).

## E. Inna działalność

W marcu 2013 r. Dyrektor PIWet-PIB powierzył mi funkcję konsultanta ds. antybiotykooporności, którego zakres obowiązków obejmuje między innymi koordynację monitorowania oporności bakterii na antybiotyki zgodnie z postanowieniami Decyzji Wykonawczej Komisji Nr 2013/652/EC<sup>16</sup>

W 2006 r. zostałem powołany przez Dyrektora PIWet-PIB w skład Pionu Naukowego Zespołu do spraw CELAB-CBD, w którym pełnię funkcję Koordynatora Działu Chorób Zakaźnych. Moje obowiązki obejmują nadzór nad jakością danych gromadzonych w Centralnej Bazie Danych zgodnie z rozporządzeniami Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi<sup>17</sup>.

W 2003 r, po odbyciu cyklu kursów organizowanych przez Polskie Centrum Badań i Akredytacji, zostałem powołany na audytora wewnętrznego. Do czasu zawieszenia pełnienia tej funkcji w 2012 r. uczestniczyłem w około 25 audytach wewnętrznych w zakładach naukowych PIWet-PIB.

W okresie od 2007 do maja 2014 r. pełniłem funkcję zastępcy kierownika ds. jakości Zakładu Mikrobiologii. W tym czasie wdrożony został system zarządzania jakością i uzyskano akredytację Polskiego Centrum Akredytacji, której zakres (AB 958) obejmuje kilkanaście procedur badawczych dotyczących diagnostyki chorób zakaźnych zwierząt.

---

<sup>16</sup> Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej, 2013, L 303

<sup>17</sup> Dziennik Ustaw 2005, Nr 48, poz. 453 i 454; Dziennik Ustaw 2011, Nr 103, poz. 598.

W latach 2004 – 2006 pełniłem funkcję zastępcy kierownika Centralnego Punktu Przyjęć Próbek PIWet-PIB.

## VII. Sumaryczne zestawienie dorobku naukowego

Rodzaj publikacji naukowej	przed obroną pracy doktorskiej	po obronie pracy doktorskiej	ogółem
<b>Prace naukowe opublikowane w czasopismach indeksowanych w bazie ISI</b>			
Liczba	9	23	32
Impact Factor	3,198	39,236	42,434
Punkty MNiSW	69	479	548
w języku polskim	5	5	10
w języku angielskim	4	18	22
pierwszy autor	1	11	12 (38%)
drugi autor	8	4	12 (38%)
trzeci lub kolejny autor	0	8	8 (24%)
<b>Prace naukowe opublikowane w czasopismach nie indeksowanych w bazie ISI</b>			
Liczba	6	28	34
Punkty MNiSW	10	181	191
w języku polskim	4	19	23
w języku angielskim	2	9	11
pierwszy autor	1	9	10 (30%)
drugi autor	5	5	10 (30%)
trzeci lub kolejny autor	0	14	14 (40%)
<b>Prace naukowe opublikowane w formie rozdziału w monografii [Scientific papers published as monograph chapter]</b>			
Liczba [Number]	0	7	7
<b>Prace naukowe opublikowane w formie doniesień na międzynarodowe konferencje naukowe</b>			
Liczba	6	49	55
Prezentowane osobiście, w tym	6	35	41
wykłady		1	1
doniesienia ustne	3	9	12
doniesienia plakatowe	3	25	28
<b>Prace naukowe opublikowane w formie doniesień na krajowe konferencje naukowe</b>			
Liczba	11	20	31
Prezentowane osobiście, w tym	11	12	21
wykłady	0	5	5
doniesienia ustne	8	6	14
doniesienia plakatowe	2	0	2

<b>Prace naukowe dotyczące działalności referencyjnej</b>	
prezentacje w trakcie spotkań Laboratoriów Referencyjnych UE	7
prezentacje w trakcie spotkań organizowanych przez Krajowe Laboratoria Referencyjne	13
opracowania badań realizowanych przez Krajowe Laboratoria Referencyjne <sup>18</sup>	6
Sprawozdania z badań biegłości organizowanych przez Krajowe Laboratoria Referencyjne	16
<b>Zgłoszenia patentowe</b>	<b>2</b>

**Raport z cytowań wg Web of Science®<sup>19</sup>**

Liczba pozycji: 35


Liczba cytowań: 229

Liczba cytowań bez autocytowań: 189

Liczba artykułów cytujących: 197

Liczba artykułów cytujących bez autocytowań: 178

Średnia liczba cytowań: 6.54

indeks *h*: 7

---

<sup>18</sup> wdrażanie decyzji Komisji Europejskiej<sup>19</sup> stan z dnia 2014-09-29

### VIII. Piśmiennictwo

1. Wasyl D., Hoszowski A., Zając M., Szulowski K.: Antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* isolated from animals at slaughter. *Front Microbiol*, **2013**. 4, (article 221): 1-12.
2. Wasyl D., Hoszowski A., Zając M., Skarżyńska M.: Simple and efficient screening method for detection of cephalosporin resistant *Escherichia coli*. *Bull Vet Inst Pulawy*, **2010**. 54, (2): 147-151.
3. Wasyl D., Hasman H., Cavaco L.M., Aarestrup F.M.: Prevalence and characterization of cephalosporin resistance in nonpathogenic *Escherichia coli* from food-producing animals slaughtered in Poland. *Microb Drug Resist*, **2012**. 18, (1): 79-82.
4. Wasyl D., Hoszowski A.: First isolation of ESBL-producing *Salmonella* and emergence of multiresistant *Salmonella* Kentucky in turkey in Poland. *Food Res Int*, **2012**. 45, (2): 958-961.
5. Wasyl D.: Mechanizmy oporności *Salmonella* na chinolony. *Medycyna Wet*, **2009**. 65, (8): 516-520.
6. Wasyl D., Hoszowski A., Zając M.: Prevalence and characterisation of quinolone resistance mechanisms in *Salmonella* spp. *Vet Microbiol*, **2014**. 171, (3-4): 307-314.
7. Wasyl D.: Prevalence and Characterization of Quinolone Resistance Mechanisms in Commensal *Escherichia coli* Isolated from Slaughter Animals in Poland, 2009-2012. *Microb Drug Resist*, **2014**. DOI: 10.1089/mdr.2014.0061.
8. Singer R.S., Williams-Nguyen J.: Human health impacts of antibiotic use in agriculture: A push for improved causal inference. **2014**. 19, (0): 1-8.
9. D'Costa V.M., King C.E., Kalan L., Morar M., Sung W.W., Schwarz C., Froese D., Zazula G., Calmels F., Debruyne R., Golding G.B., Poinar H.N., Wright G.D.: Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, **2011**, (477): 457-461.
10. Agero Y., Aarestrup F.M.: Voluntary ban on cephalosporin use in Danish pig production has effectively reduced extended-spectrum cephalosporinase-producing *Escherichia coli* in slaughter pigs. *J Antimicrob Chemother*, **2013**. 68, (3): 569-72.
11. Olsen R.H., Bisgaard M., Löhner U., Robineau B., Christensen H.: Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from poultry: a review of current problems, illustrated with some laboratory findings. **2014**. 43, (3): 199-208.
12. Bronzwaer S., Aarestrup F., Battisti A., Bengtsson B., Piriz Duran S., Emborg H.-D., Kahlmeter G., Mevius D., Regula G., Sanders P., Teale C., Wasyl D., De Smet K., Torren Edo J., Tul. P., Deluyker H., Makela P.: Harmonised monitoring of antimicrobial resistance in *Salmonella* and *Campylobacter* isolates from food animals in the European Union. *Clin Microbiol Infect*, **2008**. 14, (6): 522-533.
13. Collignon P., Powers J.H., Chiller T.M., Aidara-Kane A., Aarestrup F.M.: World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: A critical step for developing risk management strategies for the use of antimicrobials in food production animals. *Clin Infect Dis*, **2009**. 49, (1): 132-41.
14. EFSA, ECDC: The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2012. *EFSA Journal*, **2014**. 12, (3: (3590)): 1-336.
15. Wasyl D., Hoszowski A., Zając M., Oporność *Salmonella* i komensalnych *Escherichia coli* - skutek stosowania antybiotyków czy epidemiologia zakażeń?, in *Racjonalne stosowanie antybiotyków w weterynarii*, Niemczuk K., Krasucka D., (Eds.). 2013, Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy: Puławy. 199 - 236.

16. Le Hello S., Bekhit A.A., Granier S., Barua H., Beutlich J., Zając M.M., Münch S., Sintchenko V., Bouchrif B., Fashae K., Pinsard J.-L., Sontag L., Fabre L., Garnier M., Guibert V., Howard P., Hendriksen R., Christensen J.P., Biswas P.K., Cloeckaert A., Rabsch W., Wasyl D., Doublet B., Weill F.-X.: The global establishment of a highly-fluoroquinolone resistant *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 strain. *Front Microbiol*, **2013**. 4: 395.
17. Zając M., Wasyl D., Hoszowski A., Le Hello S., Szulowski K.: Genetic lineages of *Salmonella enterica* serovar Kentucky spreading in pet reptiles. *Vet Microbiol*, **2013**. 166, (3-4): 686–689.
18. Hoszowski A., Zając M.M., Lalak A., Przemysk P., Wasyl D.: Fifteen years of successful spread of *Salmonella enterica* serovar Mbandaka clone ST413 in Poland and its public health consequences. *Ann Agric Environ Med*, **2014**. in press.
19. Wasyl D., Hoszowski A.: Occurrence and characterization of monophasic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (1,4,[5],12:i:-) of non-human origin in Poland. *Foodborne Pathog Dis*, **2012**. 9, (11): 1037-1043.
20. Hoszowski A., Samcik I., Lalak A., Skarżyńska M., Wnuk D., Zając M., D. W.: Characterization of monophasic isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (1,4,[5],12:i:-). *Med. Weter*, **2014**. 70, (2): 117 - 121.
21. Kaesbohrer A., Schroeter A., Tenhagen B.A., Alt K., Guerra B., Appel B.: Emerging antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* with public health relevance. *Zoonoses Public Health*, **2012**. 59, (Suppl 2): 158-65.
22. Mazurek J., Bok E., Pusz P., Stosik M., Baldy-Chudzik K.: Phenotypic and genotypic characteristics of antibiotic resistance of commensal *Escherichia coli* isolates from healthy pigs, in *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. **2014**. 211–218.
23. van der Bij A.K., van Dijk K., Muilwijk J., Thijsen S.F., Notermans D.W., de Greeff S., van de Sande-Bruinsma N.: Clinical breakpoint changes and their impact on surveillance of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* causing bacteraemia. *Clin Microbiol Infect*, **2012**. 18, (11): E466-72.
24. EFSA: Technical specifications for the analysis and reporting of data on antimicrobial resistance in the European Union Summary Report. *EFSA Journal*, **2012**. 10, (2 (2587)): 1-53.
25. Wasiński B., Różańska H., Osek J.: Occurrence of extended spectrum  $\beta$ -lactamase and AmpC-producing *Escherichia coli* in meat samples. *Bull Vet Inst Pulawy*, **2013**. 57, (4): 513-517.
26. Allen S.E., Boerlin P., Janecko N., Lumsden J.S., Barker I.K., Pearl D.L., Reid-Smith R.J., Jardine C.: Antimicrobial resistance in generic *Escherichia coli* isolates from wild small mammals living in swine farm, residential, landfill, and natural environments in southern Ontario, Canada. *Appl Environ Microbiol*, **2011**. 77, (3): 882-8.
27. Wasyl D., Zając M., Hoszowski A., Jabłoński A., Lalak A., Samcik I., Skarżyńska M., Szulowski K.: Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from wildlife animals in Poland, in *International Conference on Diseases of Zoo and Wild Animals 2014*, Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research (IZW), European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians (EAZWV). 11.
28. Nikonorow E., Baraniak A., Gniadkowski M.: Oporność bakterii z rodziny Enterobacteriaceae na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe wynikająca z wytwarzania  $\beta$ -laktamaz. *Post. Microbiol.*, **2013**. 52, (3): 261-271.
29. Livermore D.M., Woodford N.: The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. **2006**. 14, (9): 413-20.



30. Vinue L., Saenz Y., Martinez S., Somalo S., Moreno M.A., Torres C., Zarazaga M.: Prevalence and diversity of extended-spectrum beta-lactamases in faecal *Escherichia coli* isolates from healthy humans in Spain. **2009**. 15, (10): 954-7.
31. Shaheen B.W., Nayak R., Foley S.L., Kweon O., Deck J., Park M., Rafii F., Boothe D.M.: Molecular characterization of resistance to extended-spectrum cephalosporins in clinical *Escherichia coli* isolates from companion animals in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*, **2011**. 55, (12): 5666-75.
32. Lalak A.: Występowanie oporności na cefalosporyny u indykatorych *Escherichia coli* izolowanych od zwierząt rzeźnych. *Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt* **2013**, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie: Lublin. 56.
33. Livermore D.M., Canton R., Gniadkowski M., Nordmann P., Rossolini G.M., Arlet G., Ayala J., Coque T.M., Kern-Zdanowicz I., Luzzaro F., Poirel L., Woodford N.: CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. **2007**. 59, (2): 165-74.
34. Redgrave L.S., Sutton S.B., Webber M.A., Piddock L.J.V.: Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. **2014**. 22, (8): 438-445.
35. Kaplan E., Offek M., Jurkevitch E., Cytryn E.: Characterization of fluoroquinolone resistance and qnr diversity in *Enterobacteriaceae* from municipal biosolids. *Front Microbiol*, **2013**. 4, (article 144): 1-7.
36. Dolejska M., Villa L., Hasman H., Hansen L., Carattoli A.: Characterization of IncN plasmids carrying blaCTX-M-1 and qnr genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* from animals, the environment and humans. *J Antimicrob Chemother*, **2013**. 68, (2): 333-339.
37. Wasyl D., Zając M., Hoszowski A.: Quinolone resistance in *Salmonella* Newport, in *The 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **2014**, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Barcelona.
38. Wasyl D., Zając M., Domanska-Blicharz K., Hoszowski A. "Ad hoc" study on *Salmonella* Stanley outbreak strains. in *International Symposium on Salmonella and Salmonellosis*. 2013. Saint Malo, France.
39. Le Hello S., Hendriksen R.S., Doublet B., Fisher I., Nielsen E.M., Whichard J.M., Bouchrif B., Fashae K., Granier S.A., Jourdan-Da Silva N., Cloeckaert A., Threlfall E.J., Angulo F.J., Aarestrup F.M., Wain J., Weill F.X.: International spread of an epidemic population of *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 resistant to ciprofloxacin. *J Infect Dis*, **2011**. 204, (5): 675-84.
40. Hopkins K.L., Arnold C., Threlfall E.J.: Rapid detection of gyrA and parC mutations in quinolone-resistant *Salmonella enterica* using Pyrosequencing technology. *J Microbiol Methods*, **2007**. 68, (1): 163-71.
41. Veldman K., Cavaco L.M., Mevius D., Battisti A., Franco A., Botteldoorn N., Bruneau M., Perrin-Guyomard A., Cerny T., De Frutos Escobar C., Guerra B., Schroeter A., Gutierrez M., Hopkins K., Myllyniemi A.L., Sunde M., Wasyl D., Aarestrup F.M.: International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries. *J Antimicrob Chemother*, **2011**. 66, (6): 1278-86.
42. Hoszowski A., Wasyl D., Truszczyński M.: Ocena wrażliwości szczepów *Salmonella* sp. na lityczne działanie bakteriofaga O-1 [Susceptibility for phage O-1 lysis in *Salmonella* spp. strains]. *Medycyna Wet*, **1999**. 55, (1): 34-38.
43. Hoszowski A., Wasyl D., Głównicka R., Truszczyński M.: Typy bakteriofagowe szczepów *Salmonella* Enteritidis pochodzenia zwierzęcego. *Medycyna Wet*, **1998**. 54, (10): 676-678.

44. Wasyl D.: Ocena technik typowania pałeczek *Salmonella enterica* stosowanych w badaniach epidemiologicznych salmonelozy świń, **2000**, Komitet Badań Naukowych [State Committee for Scientific Research]: Państwowy Instytut Weterynaryjny [National Veterinary Research Institute].
45. Wasyl D., Truszczyński M.: Kryteria oceny metod różnicowania epidemiologicznego patogenów bakteryjnych. *Medycyna Wet.*, **2005**. 61, (3): 249-252.
46. Wasyl D., ElSedawy A., Lukinmaa S.: PulseNet Europe - international molecular typing network for foodborne pathogens surveillance [PulseNet Europe międzynarodowa sieć typowania molekularnego w nadzorze epidemiologicznym chorób szerzących się drogą pokarmową]. *Medycyna Wet.*, **2008**. 64, (2): 123-126.
47. Wasyl D., Hoszowski A., Brzana A., Skarżyńska M., Szwarz M., Wnuk D., Lalak A.: Izolacja *Salmonella* Anatum o nietypowych właściwościach biochemicznych. *Medycyna Wet.*, **2009**. 65, (9): 624-628.
48. Hoszowski A., Wasyl D.: Znaczenie epidemiologiczne oraz identyfikacja jednofazowych szczepów *Salmonella* Typhimurium 1,4,[5],12:i:-. *Medycyna Wet.*, **2011**. 67, (9): 589-593.
49. Zając M., Hoszowski A., Wasyl D.: Identification of common, non-typable and autoagglutinating *Salmonella* strains with Premi®Test *Salmonella* Assay Acta Vet Hung, **2013**. 61, (4): 425-431.
50. Stankievicius A., Wasyl D., Jablonski A., Stankieviciene M., Pejsak Z.: One tube nested PCR for the detection of *Salmonella* sp in swine faeces. *Bull Vet Inst Pulawy*, **2006**. 50, (1): 35-39.
51. Hoszowski A., Wasyl D.: Pożywka agarowa AKG do ekspresji faz antygenów rzęskowych *Salmonella*, sposób jej wytwarzania oraz zastosowanie pożywki do identyfikacji antygenów rzęskowych *Salmonella*, **2012**, P-401498 (data zgl. 07.11.2012)
52. Zając M., Wasyl D., Hoszowski A., Skarżyńska M., Lalak A., Samcik I., Wnuk D.: Sposób rewersji faz antygenów rzęskowych *Salmonella* spp. metodą mostka bibułowego i zastosowanie pożywki AKG do rewersji faz antygenów rzęskowych, **2012**, P-401499 (data zgl. 07.11.2012).
53. Hoszowski A., Wasyl D.: Rola gadów jako źródła zakażeń człowieka pałeczkami *Salmonella*. *Życie Wet.*, **1998**. 73, (12): 464-466.
54. Fafiński Z., Wasyl D.: Zakażenia gadów pałeczkami *Salmonella*. *Życie Wet.*, **2000**. 75, (7): 391-392.
55. Wasyl D., Hoszowski A., Fafiński Z.: Salmoneloza u papug i emu. *Medycyna Wet.*, **1999**. 55, (10): 662-665.
56. Pejsak Z., Wasyl D., Hoszowski A., Kneblewski P.: Salmoneloza świń - problem oczekujący na rozwiązanie. *Medycyna Wet.*, **2005**. 61, (9): 963-967.
57. Wasyl D., Hoszowski A.: The status of *Salmonella* control in Poland. **2005**. 21, (8): 33-34.
58. Zając M., Hoszowski A., Wasyl D., Szulowski K.: *Salmonella* u gadów - epidemiologia zakażeń i zagrożenie dla zdrowia publicznego. *Medycyna Wet.*, **2011**. 67, (6): 376-379.
59. Kukier E., Goldsztejn M., Grenda T., Kwiatek K., Wasyl D., Hoszowski A.: Microbiological quality of compound feed used in Poland. *Bull Vet Inst Pulawy*, **2012**. 56, (3): 349-354.
60. Kwiatek K., Kukier E., Wasyl D., Hoszowski A.: Jakość mikrobiologiczna mieszanek paszowych w Polsce. *Medycyna Wet.*, **2008**. 64, (7): 949-954.

61. Hoszowski A., Wasyl D., Truszczyński M.: Epidemiological investigation of *Salmonella* serovar Mbandaka strains isolated from animals, their feed and food products in Poland during the years 1995 - 1997. *Polish J Vet Sci*, **1999**. 2, (1): 43-48.
62. Hoszowski A., Wasyl D.: Typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Mbandaka isolates. *Vet Microbiol*, **2001**. 80, (2): 139-48.
63. EFSA, ECDC: The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *EFSA Journal*, **2013**. 11, (4): 1-255.
64. Wasyl D., Zając M., Brown D.J., Kuronen H., Van der Zwaluw K., Hoszowski A.: Molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Saintpaul isolated from animals, food, and humans in 12 European Countries. *Bull Vet Inst Pulawy*, **2012**. 56, (4): 459-466.
65. Wasyl D., Sandvang D., Skov M.N., Baggesen D.L.: Epidemiological characteristics of *Salmonella* Typhimurium isolated from animals and feed in Poland. *Epidemiol Infect*, **2006**. 134, (1): 179-85.
66. Hoszowski A., Lalak A., Zając M., Samcik I., Skarżyńska M., Wnuk D., Wasyl D.: Pokrewieństwo szorstkich szczepów *Salmonella* z reprezentantami niektórych serowarów stwierdzanych u zwierząt. *Medycyna Wet*, **2011**. 67, (3): 194-197.