

dr Małgorzata Olejnik

Zakład Farmakologii i Toksykologii
Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy
w Puławach



AUTOREFERAT

Puławy 2016

1. Imię i nazwisko

Małgorzata Olejnik

2. Posiadane tytuły zawodowe i stopnie naukowe

- 2009 Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach
doktor nauk weterynaryjnych
na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „Pozostałości kokcydiostatyków w tkankach zwierząt i jajach”
- 2005 Uniwersytet Medyczny im. Feliksa Skubiszewskiego w Lublinie
magister farmacji

3. Pozostałe informacje o wykształceniu

- 2012-2013 Wyższa Szkoła Bankowa w Poznaniu
Studia podyplomowe „Menadżer projektu badawczo-rozwojowego”
- 2006-2007 Uniwersytet im. Mikołaja Kopernika w Toruniu
Studia podyplomowe „Analityka w ochronie środowiska”

4. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- Od 2012 adiunkt w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach
- 2010-2012 staż podoktorski w Laboratoire d'Etude des Residues et Contaminants dans les Aliments (LABERCA) w Nantes, Francja
- 2009-2010 adiunkt w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach
- 2009 główny specjalista badawczo-techniczny w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach
- 2004-2008 doktorant w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

5. 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.):

Osiągnięcie naukowe „Zanieczyszczenia pasz kokcydiostatykami a bezpieczeństwo żywności pochodzenia zwierzęcego” tworzy jednotematyczny cykl następujących publikacji:

H-1. Małgorzata Olejnik, Piotr Jedziniak, Teresa Szprengier-Juszkiewicz: The determination of six ionophore coccidiostats in feed by liquid chromatography with postcolumn derivatisation and spectrophotometric/fluorescence detection. Scientific World Journal 2013, Article Number: 763402.

IF₂₀₁₃ = 1,219, MNiSW₂₀₁₃ = 30, liczba cytowań = 0

Udział własny: 70%, opracowanie koncepcji pracy, opracowanie wyników, przygotowanie pracy do druku

H-2. Edyta Protasiuk, Małgorzata Olejnik, Teresa Szprengier-Juszkiewicz, Piotr Jedziniak, Jan Źmudzki: Determination of nicarbazin in animal feed by high-performance liquid chromatography with interlaboratory evaluation. Analytical Letters 2015, 48, 2183-2194.

IF₂₀₁₄ = 1,030, MNiSW₂₀₁₄ = 20, liczba cytowań = 0

Udział własny: 50%, udział w opracowaniu koncepcji pracy i opracowaniu wyników, redakcja merytoryczna pracy

H-3. Konrad Pietruk, Małgorzata Olejnik, Piotr Jedziniak, Teresa Szprengier-Juszkiewicz: Determination of fifteen coccidiostats in feed at carry-over levels using liquid chromatography- mass spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2015, 112, 50-59.

IF₂₀₁₄ = 2,979, MNiSW₂₀₁₄ = 35, liczba cytowań = 1

Udział własny: 40%, udział w opracowaniu koncepcji pracy i opracowaniu wyników, redakcja merytoryczna pracy

H-4. Małgorzata Olejnik, Teresa Szprengier-Juszkiewicz, Piotr Jedziniak, Edyta Śledzińska, Iwona Szymanek-Bany, Beata Korycińska, Konrad Pietruk, Jan Źmudzki: Residue control of coccidiostats in food of animal origin in Poland during 2007-2010. Food Additives and Contaminants Part B 2011 4, 259-267.

IF₂₀₁₁ = 0,891, MNiSW₂₀₁₂ = 20, liczba cytowań = 3

Udział własny: 70%, opracowanie koncepcji pracy, opracowanie wyników, przygotowanie pracy do druku

H-5. Małgorzata Olejnik, Teresa Szprengier-Juszkiewicz, Piotr Jedziniak: Semduramicin in eggs - The incompatibility of feed and food maximum levels. Food Chemistry 2014, 149, 178-182.

IF₂₀₁₄ = 3,391, MNiSW₂₀₁₄ = 40, liczba cytowań = 4

Udział własny: 85%, opracowanie koncepcji pracy, opracowanie wyników, przygotowanie pracy do druku

H-6. Małgorzata Olejnik, Teresa Szprengier-Juszkiewicz, Piotr Jedziniak: Distribution of semduramicin in hen tissues in eggs after administration of cross-contaminated feed. Food Additives and Contaminants: Part A 2014, 31, 1393-1398.

IF₂₀₁₄ = 1,802, MNiSW₂₀₁₄ = 30, liczba cytowań = 0

Udział własny: 85%, opracowanie koncepcji pracy, opracowanie wyników, przygotowanie pracy do druku

H-7. Małgorzata Olejnik, Teresa Szprengier-Juszkiewicz: Deposition and depletion of decoquinat in eggs after administration of cross-contaminated feed. Food Additives and Contaminants: Part A 2015, 32, 1124-1128.

IF₂₀₁₄ = 1,802, MNiSW₂₀₁₄ = 30, liczba cytowań = 0

Udział własny: 90%, opracowanie koncepcji pracy, opracowanie wyników, przygotowanie pracy do druku

Kokcydiostatyki są stosowane powszechnie jako dodatki paszowe w profilaktyce kokcydiozy u drobiu i królików. Mimo niewątpliwej wygody stosowania kokcydiostatyków w tej postaci istnieją pewne zagrożenia związane z bezpieczeństwem podawania substancji farmakologicznie czynnych jako dodatków paszowych. Podczas produkcji, magazynowania i transportu pasz może dojść do niezamierzonego zanieczyszczenia kokcydiostatykami pasz przeznaczonych dla zwierząt, które kokcydiostatyków nie powinny otrzymywać. Te zanieczyszczenia z kolei mogą powodować występowanie pozostałości kokcydiostatyków w tkankach zwierząt i produktach spożywczych pochodzących od zwierząt (jaja, mleko).

Ze względu na potencjalne zagrożenie dla konsumentów, zagadnieniem tym zajęły się w ostatnich latach Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (European Food Safety Authority, EFSA) (Dorne et al., 2013) oraz Komisja Europejska (Anon, 2009a, 2009b, 2011). Przeprowadzona przez EFSA analiza ryzyka związanego z obecnością kokcydiostatyków w paszy (Dorne et al., 2013) wykazała, że jedynie w przypadku halofuginonu istnieje prawdopodobieństwo wystąpienia zagrożenia dla konsumentów.

Mimo niewielkiej, jak się wydaje na podstawie dotychczasowych badań, szkodliwości dla konsumentów konieczne są dalsze badania w tym zakresie. Po pierwsze, wspomniana analiza ryzyka wykazała, że pasza zanieczyszczona salinomycyną na poziomie 2% najwyższej dopuszczalnej zawartości i monenzyną na poziomie 5% może być już toksyczna dla koni. Po drugie, eksperci z konieczności bazując na dostępnych, często niepełnych danych, ekstrapolowali wyniki uzyskane w badaniach farmakokinetycznych na zwierzętach docelowych (przeważnie kurczętach brojlerach) na pozostałe gatunki i kategorie zwierząt.

W związku z pojawiającymi się wątpliwościami dotyczącymi dostępnych danych, wyodrębniłam następujące problemy badawcze, które znalazły się w sferze moich zainteresowań naukowych:

1) opracowanie metod oznaczania kokcydiostatyków w paszach docelowych (**H-1** i **H-2**) oraz wykrywania zanieczyszczeń kokcydiostatykami pasz niedocelowych (**H-2** i **H-3**);

- 2) określenie stopnia występowania kokcydiostatyków w żywności pochodzenia zwierzęcego w powiązaniu z zanieczyszczeniem pasz (H-4);
- 3) określenie stopnia dystrybucji oraz kinetyki zanikania wybranych kokcydiostatyków w tkankach kur i jajach po eksperymentalnym podaniu zwierzętom zanieczyszczonej paszy (H-5, H-6 i H-7).

Na etapie planowania badań uwzględniłam wyniki dotyczące przechodzenia kokcydiostatyków z paszy do produktów pochodzenia zwierzęcego oraz obowiązujące prawodawstwo. Szczególnie istotne są tutaj wprowadzone w roku 2009 maksymalne zawartości (maximum level, ML) kokcydiostatyków w paszach niedocelowych oraz w żywności pochodzącej od zwierząt niedocelowych. Maksymalna zawartość kokcydiostatyków w paszach niedocelowych (czyli paszach przeznaczonych dla gatunków i kategorii zwierząt innych niż wymienione w dokumentach autoryzacyjnych) została ustalona na poziomie 1% lub 3% najwyższego dopuszczonego stężenia docelowego. Dla tkanek i produktów pochodzenia zwierzęcego wartość maksymalnej zawartości wyznaczona została na podstawie danych dostępnych w piśmiennictwie naukowym: jest to stężenie, jakie powinno teoretycznie znaleźć się w danej matrycy po podaniu zwierzęciu zanieczyszczonej kokcydiostatykiem paszy (na poziomie maksymalnej zawartości).

Opracowanie metod oznaczania kokcydiostatyków w paszach docelowych oraz wykrywania zanieczyszczeń kokcydiostatykami pasz niedocelowych

W trakcie wcześniejszych badań, prowadzonych przeze mnie w ramach pracy doktorskiej, opracowałam wieloskładnikowe metody oznaczania pozostałości kokcydiostatyków w tkankach zwierząt i jajach (Olejnik et al. 2009, 2010). Metody te zostały w 2007 roku włączone do realizacji Krajowego Programu Badań Kontrolnych Pozostałości Chemicznych, Biologicznych i Leków.

Jednak dla pełnej kontroli łańcucha żywnościowego niezbędne jest dysponowanie wiarygodnymi metodami oznaczania kokcydiostatyków w paszach, zarówno docelowych, jak i niedocelowych. Metody te mają zastosowanie do analizy podejrzanych próbek pasz, pobranych w ramach dochodzeń inspekcji weterynaryjnej po stwierdzeniu niezgodnych z prawem pozostałości kokcydiostatyków. Mogą być także włączone do urzędowej kontroli pasz, stanowiącej równie istotny czynnik kontroli łańcucha żywnościowego.

W związku z tym podjęłam się opracowania metod oznaczania najczęściej stosowanych kokcydiostatyków w paszach docelowych (nikarbazyna oraz kokcydiostatyki jonoforowe: lazalocyd, maduramycyna, monenzyna, narazyna, salinomycyna i semduramycyna) oraz wykrywania zanieczyszczeń wszystkimi dopuszczonymi do stosowania kokcydiostatykami w paszach niedocelowych.

Wieloskładnikowa metoda oznaczania wszystkich 6 dopuszczonych do stosowania kokcydiostatyków jonoforowych (H-1) opiera się w znacznej mierze na międzynarodowej normie zatwierdzonej do oznaczania

monenzyny, salinomycyny i narazyny (Anon, 2005). Główne modyfikacje miały na celu włączenie do metody pozostałych trzech kokcydiostatyków jonoforowych (lazalocydu, maduramycyny i semduramycyny) i dotyczyły optymalizacji warunków rozdziału chromatograficznego oraz warunków przeprowadzania reakcji pokolumnowej derywatywacji z waniliną.

Dla uzyskania odpowiedniej czułości oznaczania maduramycyny i semduramycyny konieczne było zwiększenie temperatury tworzenia pochodnej z waniliną do 110°C. Zastosowanie fazy ruchomej o odczynie obojętnym (fosforan potasu o pH 7,0) pozwoliło uzyskać symetryczne i smukłe piki dla wszystkich analitów. Zadawalający rozdział monenzyny i semduramycyny został uzyskany w warunkach izokratycznych na kolumnie z wypełnieniem typu core-shell, przy akceptowanym czasie analizy chromatograficznej (20 min). Wiarygodność opracowanej metody została potwierdzona w procesie walidacji i w międzynarodowych badaniach biegłości.

Nikarbazyna jest jednym z najważniejszych kokcydiostatyków chemicznych ze względu na jej powszechne użycie i zdolność kumulowania się w jajach. Z tego względu przeprowadziłam badania mające na celu opracowanie metody oznaczania tego kokcydiostatyku w paszach docelowych i niedocelowych (**H-2**), wykorzystując technikę chromatografii cieczowej, która jest tania, wiarygodna i dostępna w większości laboratoriów. Opracowałam dwa schematy przygotowania próbek, zależne od oczekiwanego stężenia kokcydiostatyków w badanej paszy. Niezależnie od celu analizy, próbki paszy były ekstrahowane 90% roztworem acetonitrylu, a następnie rozcieńczane (pasje docelowe) lub oczyszczane techniką ekstrakcji do fazy stałej (zanieczyszczenia). Dla obu procedur zostały zastosowane jednakowe warunki chromatograficzne o całkowitym czasie analizy wynoszącym zaledwie 10 minut.

Metodę sprawdzono w badaniach międzylaboratoryjnych zorganizowanych w ramach działalności referencyjnej Zakładu Farmakologii i Toksykologii dla laboratoriów Zakładów Higieny Weterynaryjnej. Wyniki ilościowe uzyskane przez wszystkich uczestników porównania były poprawne, trzy laboratoria wykryły jednak nikarbazynę w dwóch próbkach ślepych (wyniki fałszywie dodatnie). Okazało się, że laboratoria te zmodyfikowały procedurę, skracając czas analizy chromatograficznej, przez co nikarbazyna i obecne w matrycy substancje interferujące wyeluowały w tym samym czasie. Uzyskane w ramach porównania wyniki potwierdziły wiarygodność metody, jednocześnie wykazały, że właściwy rozdział chromatograficzny jest czynnikiem warunkującym selektywność metody i wiarygodność uzyskiwanych wyników.

Największym wyzwaniem było opracowanie metody jednoczesnego oznaczania wszystkich kokcydiostatyków dopuszczonych jako dodatki paszowe, obecnych w paszach na poziomie zanieczyszczeń krzyżowych (**H-3**). Z jednej strony opracowana metoda musi być wystarczająco czuła, by zapewnić wiarygodne wyniki dla kokcydiostatyków, dla których ustalone maksymalne zawartości są najniższe (diklazuril 0,01 mg/kg; halofuginon 0,03 mg/kg). Jednocześnie, ze względu na znane z piśmiennictwa i własnego doświadczenia trudności z ilościowym oznaczaniem kokcydiostatyków jonoforowych techniką chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (spowodowane m.in. efektem matrycy), konieczne było znaczne rozcieńczenie ekstraktu.

Ze względu na powyższe trudności, niewiele jest prac opisujących metody jednoczesnego oznaczania zanieczyszczeń pasz kokcydiostatykami jonoforowymi i chemicznymi (Cronly et al., 2011; Delahaut et al. 2010; Moretti et al., 2013). Spośród wymienionych trzech metod dwie charakteryzują się skomplikowanym postępowaniem z próbką, uzależnionym od wykrywanego kokcydiostatyku i/lub jego stężenia w paszy (kilka dozowań tej samej próbki), a trzeciej, prawdopodobnie ze względu na różnice w aparaturze, nie udało się powtórzyć w warunkach laboratorium Zakładu Farmakologii i Toksykologii PIWet-PIB.

Dlatego zdecydowałam się na opracowanie nowej metody oznaczania kokcydiostatyków w paszach niedocelowych (**H-3**), włączając do jej zakresu dodatkowo amprolium, etopabat, klopidol i toltrazuril (poza 11 kokcydiostatykami dopuszczonymi do stosowania jako dodatki paszowe). Metoda jest niezwykle szybka i prosta – paszę ekstrahuje się dwukrotnie (w środowisku kwaśnym, a następnie zasadowym), a uzyskany ekstrakt analizuje się bezpośrednio przy zastosowaniu techniki LC-MS/MS.

Opracowana metoda została zwalidowana z uwzględnieniem zmienności matrycy jako jednego z czynników. Całościową precyzję metody wyznaczono po analizie pięciu różnych rodzajów pasz (dla trzody chlewnej, indyków, kurcząt brojlerów, kur niosek i bydła). Takie podejście było niezwykle efektywne czasowo (brak konieczności oddzielnej walidacji dla każdej matrycy). Jednocześnie pozwoliło ocenić rzeczywistą wiarygodność uzyskiwanych wyników ilościowych, wiadomo bowiem, że zmienność matrycy jest w znacznym stopniu odpowiedzialna za problemy z oznaczaniem kokcydiostatyków jonoforowych. Wiarygodność metody została potwierdzona w badaniach biegłości organizowanych przez Wspólnotowe Laboratorium Referencyjne (IRMM, Geel, Belgia).

Praca **H-3** podejmuje także temat tworzenia uniwersalnych, znormalizowanych metod przy zastosowaniu techniki LC-MS/MS. Na przykładzie oznaczania kokcydiostatyków w paszy opisano problemy w bezpośrednim transferze metody na inny aparat, nie zawsze w pełni równorzędny pod względem czułości, stabilności i wydajności. Zweryfikowano przydatność techniki dodatku wzorca w ograniczaniu wpływu matrycy na wyniki ilościowe. Mimo że jest to metoda zalecana przez Wspólnotowe Laboratorium Referencyjne ds. Dodatków Paszowych (Vincent et al. 2011), nie zaobserwowano, by dawała jakiegokolwiek korzyści. Wręcz przeciwnie, często uzyskane tą techniką wyniki charakteryzowały się znacznie gorszą precyzją.

Podsumowując, wszystkie opracowane metody spełniają międzynarodowe wymagania dotyczące metod analitycznych; ich wiarygodność została sprawdzona w badaniach międzylaboratoryjnych i badaniach biegłości. Mogą być zastosowane nie tylko w celach naukowych, ale także w badaniach urzędowych – wieloskładnikowa procedura oznaczania kokcydiostatyków w paszach została przekazana rutynowym laboratoriom Zakładów Higieny Weterynaryjnej i od roku 2017 zostanie wdrożona do realizacji planu urzędowej kontroli pasz.

Najważniejsze osiągnięcia tego etapu badań stanowią:

- możliwość jednoczesnego oznaczania wszystkich kokcydiostatyków jonoforowych techniką chromatografii cieczowej,
- możliwość oznaczania nikarbazyny na poziomie docelowym i niedocelowym przy niewielkiej modyfikacji procedury analitycznej;
- prostota i efektywność czasowa metody oznaczania 15 kokcydiostatyków w paszach niedocelowych (całość danych zbierana z jednego dozowania próbki);
- zaproponowany efektywny schemat doświadczenia walidacyjnego;
- wykazanie, że metoda dodatku wzorca nie stanowi rozwiązania dla problemów z analizą ilościową kokcydiostatyków jonoforowych.

Występowanie pozostałości kokcydiostatyków w żywności i ich związek z zanieczyszczeniem pasz

Wprowadzenie wieloskładnikowej metody oznaczania kokcydiostatyków w tkankach zwierząt i jajach do realizacji Krajowego Programu Badań Kontrolnych Pozostałości Chemicznych, Biologicznych i Leków pozwoliło określić rzeczywisty stopień występowania pozostałości kokcydiostatyków w żywności pochodzenia zwierzęcego. Wcześniejsze badania (do roku 2006) wykazywały jedynie istotny odsetek próbek dodatnich dla lazalocydu w wątrobie kurcząt. Pozostałe kokcydiostatyki były oznaczane niewystarczająco czułymi metodami (monenzyna, narazyna, salinomycyna) lub w niewystarczającej liczbie próbek (nikarbazyna).

W latach 2007-2010 przebadano w Polsce 3533 próbki wątrób zwierząt i jaj na obecność pozostałości kokcydiostatyków (**H-4**). W tym czasie laboratoria Zakładów Higieny Weterynaryjnej nie dysponowały jeszcze metodą wieloskładnikową i wykonywały oznaczenia jedynie lazalocydu (1982 próbki). W Zakładzie Farmakologii i Toksykologii przebadano 44% próbek (1551), ale wykryto aż 89% wyników niezgodnych (57 z 64 próbek).

Kokcydiostatyki wykryto w jednej próbce wątroby indyczej, wszystkie pozostałe wyniki niezgodne dotyczyły wątrób kurcząt (49 wyników) i jaj kurzych (14 wyników), co przedstawia Tabela 1. Najczęściej stwierdzano lazalocyd (23 wyniki), nikarbazynę (19 wyników) i salinomycynę (10 wyników).

Przeprowadzone postępowania wyjaśniające (w tym – analiza próbek pasz) dostarczyły informacji na temat przyczyn występowania pozostałości kokcydiostatyków. Odsetek niezgodnych próbek pasz był wysoki (31%), a w większości przypadków stwierdzano w nich te same kokcydiostatyki, które wcześniej wykrywano w żywności produkowanej przez dane gospodarstwo.

W ten sposób potwierdzono przyczynę większości niezgodnych wyników próbek jaj (dla nikarbazyny, salinomycyny i semduramycyny). Niestety, w przypadku pozostałości w wątrobach kurcząt, sytuacja nie była już tak klarowna. Kokcydiostatyki wykryto tylko w 6 próbkach paszy finiszera dla kurcząt brojlerów, często w stężeniach zbyt niskich, by mogły być przyczyną niezgodnego wyniku w wątrobie (Henri et al. 2011). Wydaje

się, że w takich wypadkach przyczyną przekroczeń dozwolonych prawnie limitów pozostałości mogły być zbyt krótki okres karencji lub zbyt wysokie stężenie kokcydiostatyków w paszy typu „grower”. Niestety, nie przysłano takich próbek do badań, nie było zatem możliwe ustalenie najbardziej prawdopodobnych przyczyn występowania pozostałości kokcydiostatyków w wątrobie kurcząt.

Tabela 1. Wyniki niezgodne stwierdzone w ramach realizacji Krajowego Programu Badań Kontrolnych Pozostałości Chemicznych, Biologicznych i Leków w Polsce w latach 2007-2010

Kokcydiostatyk	Wątroba kurcząt		Pasza typu „finiszer” dla kurcząt	
	Liczba próbek niezgodnych	Zakres stężeń, µg/kg	Liczba próbek niezgodnych	Zakres stężeń, mg/kg
Lazalocyd	21	150-1300		
Maduramycyna	6	17-86	1	1,1
Nikarbazyna	14	290-2800	1	2,2
Robenidyna	1	53		
Salinomycyna	7	8,3-88	4	0,37-1,5
Razem	49		6	
	Jaja kurze		Pasza dla kur niosek	
	Liczba próbek niezgodnych	Zakres stężeń, µg/kg	Liczba próbek niezgodnych	Zakres stężeń, mg/kg
Lazalocyd	2	280-320		
Maduramycyna	1	17		
Monenzyna			1	2,3
Narazyna			1	2,7
Nikarbazyna	5	16-150	2	1,0-1,1
Salinomycyna	3	6,3-75	5	0,22-0,37
Semduramycyna	3	31-180	7	0,50-8,8
Razem	14		19	

Należy także zwrócić uwagę, że unormowania prawne w zakresie maksymalnych limitów pozostałości (MRL, maximum residue limit) i maksymalnych zawartości (ML, maximum limit) kilkakrotnie zmieniły się w ciągu okresu prowadzenia badań. Znaczenie ma zwłaszcza wprowadzony w 2010 roku MRL dla nikarbazyny w wątrobie kurcząt (15 000 µg/kg). Uwzględnienie tej wartości sprawiłoby, że żaden ze stwierdzonych wyników niezgodnych w wątrobie nie byłby w gruncie rzeczy niezgodny.

Pozostałości kokcydiostatyków w żywności pochodzenia zwierzęcego są wypadkową dwóch czynników – częstości stosowania danego dodatku paszowego i jego właściwości farmakokinetycznych. Ze względu na bardzo szybką eliminację z organizmu zwierząt, monenzyna i narazyna praktycznie nie są stwierdzane w badaniach kontrolnych pozostałości na świecie, mimo ich częstego użycia w gospodarstwach (Kennedy et al. 1998). Po uwzględnieniu nowych toksykologicznych i prawnych limitów (wysokie wartości MRL dla nikarbazyny i lazalocydu), salinomycyna pozostaje jedynym kokcydiostatykiem, dla którego istnieje podwyższone ryzyko stwierdzenia niezgodnych z prawem pozostałości.

Najważniejsze osiągnięcia tego etapu badań stanowią:

- wykazanie rzeczywistego stopnia zanieczyszczenia polskiej żywności kokcydiostatykami dzięki zastosowaniu wieloskładnikowej metody ich oznaczania;
- wykazanie, że pozostałości kokcydiostatyków w polskiej żywności nie stanowią zagrożenia dla konsumentów;
- potwierdzenie związku pomiędzy zanieczyszczeniem paszy a występowaniem pozostałości kokcydiostatyków w żywności pochodzenia zwierzęcego.

Określenie kinetyki zanikania wybranych kokcydiostatyków w tkankach kur i jajach po eksperymentalnym podaniu zwierzętom zanieczyszczonej paszy

Badania przeprowadzono dla dwóch wybranych kokcydiostatyków: semduramycyny (maksymalna zawartość, ML: 0,25 mg/kg paszy; 2 µg/kg żywności pochodzenia zwierzęcego) oraz dekokwinatu (ML: 0,4 mg/kg paszy; 20 µg/kg jaj). Wybrałam właśnie te związki, ponieważ w piśmiennictwie naukowym nie było dotychczas badań charakteryzujących ich dystrybucję i zanikanie u zwierząt niedocelowych (semduramycyna) lub badania przeprowadzono stosunkowo dawno, a oznaczenia wykonano znacznie mniej czułymi technikami analitycznymi (dekokwinat) (Kouba et al., 1972; Nose et al. 1982).

Prace H-5 i H-6 opisują dystrybucję i zanikanie semduramycyny w tkankach i jajach po jej doświadczalnym podaniu kurom w paszy w stężeniu odpowiadającym zanieczyszczeniu krzyżowemu kokcydiostatyku (0,27 mg/kg, ML – 0,25 mg/kg). Jaja pobierano codziennie przez cały okres doświadczenia (14 dni podawania zanieczyszczonej paszy i 14 dni karencji), tkanki do badań pochodziły zaś od 6 kur uśmierconych w ostatnim dniu podawania paszy z semduramycyną.

Pozostałości semduramycyny zostały wykryte w jajach już w trzecim dniu podawania zanieczyszczonej paszy, a w jedenastym dniu osiągnęły poziom plateau wynoszący $16,1 \pm 5,19$ µg/kg. Poziom ten znacznie przekraczał wyznaczoną maksymalną zawartość kokcydiostatyków w jajach (2 µg/kg).

Podobna sytuacja miała miejsce w przypadku maduramycyny, dla której w związku z nowymi wynikami badań podwyższono maksymalną zawartość w jajach (Anon, 2012; Bodi et al. 2012; Varenina et al. 2015). Otrzymane przeze mnie wyniki są przesłanką do podjęcia podobnych działań dla semduramycyny. W pracy H-5 zaproponowałam ML w jajach na poziomie 30 µg/kg – jest to wartość bezpieczna dla konsumentów żywności pochodzenia zwierzęcego, a jednocześnie dobrze oddaje proces przechodzenia kokcydiostatyku z paszy do jaj, z uwzględnieniem zmienności biologicznej tego procesu (żaden z indywidualnych wyników w przeprowadzonym przeze mnie doświadczeniu nie przekroczył 30 µg/kg).

Poza jajami, semduramycynę wykryto głównie w matrycach zawierających znaczne ilości tłuszczu – w żółtkach (28,8 µg/kg), kulach żółtkowych (19,5 µg/kg) i wątrobie (2,57 µg/kg). Z drugiej strony, nie wykryto pozostałości

semduramycyny w mięśniach (zarówno piersiowych, jak i udowych) powyżej granicy oznaczalności metody (0,1 µg/kg), co jest szczególnie istotne z punktu widzenia bezpieczeństwa konsumentów.

Prezentowane prace jako pierwsze na świecie opisują dystrybucję semduramycyny u zwierząt niedocelowych. Stwierdzone stężenia w jajach były znacznie wyższe niż to założono przy ustalaniu maksymalnych wartości. Jednak, jak wykazano w pracy **H-5**, nawet te stosunkowo wysokie stężenia semduramycyny w jajach nie stanowią realnego zagrożenia dla konsumentów. Pozostałości semduramycyny w pozostałych matrycach jadalnych (mięśnie, serce, wątroba) także były nieistotne z punktu widzenia toksykologicznego. Wyniki prezentowanej pracy pozwalają zatem stwierdzić, że ustalona maksymalna zawartość semduramycyny w paszy dla zwierząt niedocelowych (0,25 mg/kg) gwarantuje bezpieczeństwo żywności w zakresie pozostałości tego kokcydiostatyku.

Podobne doświadczenie zostało przeprowadzone także dla dekokwinatu (**H-7**). Kurom noskom podawano przez 14 dni paszę zanieczyszczoną tym kokcydiostatykiem w stężeniu zbliżonym do maksymalnej zawartości (0,34 mg/kg; ML – 0,4 mg/kg). Pozostałości dekokwinatu oznaczono w próbkach jaj, białek i żółtek pobranych w trakcie podawania zanieczyszczonej paszy i przez 14 dni karencji.

Dekokwinat wykryto w jajach w czwartym dniu podawania zanieczyszczonej paszy. Poziom plateau (8.91 ± 2.888 µg/kg) został osiągnięty w jedenastym dniu i utrzymywał się do czwartego dnia podawania paszy niezawierającej kokcydiostatyku. Następnie stężenie dekokwinatu stopniowo zmniejszało się, jednak nawet po 14 dniach od odstawienia paszy z dekokwinatem był on wciąż wykrywalny w jajach.

Stężenie dekokwinatu w żółtkach było znacznie wyższe niż w białkach (ok. 22 razy), co potwierdza lipofilny charakter kokcydiostatyku i tłumaczy długi okres jego utrzymywania się w jajach. Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze obserwacje (Kouba et al. 1972; Nose et al. 1982; Seman et al. 1989).

Szczególnie istotny jest fakt, że stężenie dekokwinatu nie przekroczyło maksymalnej zawartości (20 µg/kg) w żadnej próbce jaj z przeprowadzonego doświadczenia. Można zatem stwierdzić, że pozostałości tego kokcydiostatyku w jajach nie stanowią zagrożenia dla konsumentów żywności. Co więcej, duża zgodność uzyskanych danych doświadczalnych z założonym transferem dekokwinatu do jaj, będącym podstawą wyznaczenia maksymalnej zawartości, ułatwia interpretację ewentualnych wyników niezgodnych. Każdy taki

wynik w zakresie pozostałości dekokwinatu w jajach powinien inicjować administracyjne działania wyjaśniające, bowiem, w przeciwieństwie do prezentowanych wcześniej przypadków maduramycyny (Bodi et al. 2012; Varenina et al. 2015) i semduramycyny (**H-5**), mało prawdopodobne jest, aby podanie zgodnej z wymaganiami paszy powodowało przekroczenie maksymalnej zawartości w jajach.

Najważniejsze osiągnięcia tego etapu badań stanowią:

- wykazanie, że maksymalna zawartość (ML) semduramycyny w jajach została niewłaściwie oszacowana;

- zaproponowanie nowej wartości ML dla semduramycyny w jajach – 30 µg/kg;
- wykazanie, że żywność pochodząca od zwierząt otrzymujących paszę zanieczyszczoną semduramycyną nie stanowi zagrożenia dla konsumentów;
- potwierdzenie wcześniejszych wyników będących podstawą wyznaczenia maksymalnej zawartości dekokwinatu w jajach.

Piśmiennictwo

- Anon. (2005). Animal feeding stuffs. Determination of monensin, narasin and salinomycin contents. Liquid chromatographic method using post-column derivatization, *ISO 14183*.
- Anon. (2009a). Commission Directive 2009/8/EC of 10 February 2009 amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council as regards maximum levels of unavoidable carry-over of coccidiostats or histomonostats in nontarget feed. *Official Journal of the European Union L*, 40, 19–25.
- Anon. (2009b). Commission Regulation (EC) No 124/2009 of 10 February 2009 setting maximum levels for the presence of coccidiostats or histomonostats in food resulting from the unavoidable carry-over of these substances in non-target feed. *Official Journal of the European Union L*, 40, 7–11.
- Anon. (2011). Commission Regulation (EU) No 574/2011 of 16 June 2011 amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council as regards maximum levels for nitrite, melamine, Ambrosia spp. and carry-over of certain coccidiostats and histomo. *Official Journal of the European Union L*, 159, 7–24.
- Anon. (2012). Commission Regulation (EU) No 610/2012 of 9 July 2012 amending Regulation (EC) No 124/2009 of 10 February 2009 setting maximum levels for the presence of coccidiostats or histomonostats in food resulting from the unavoidable carry-over of these substances. *Official Journal of the European Union L*, 178, 1–3.
- Bodi, D., Fry, H., Schafft, H., Lahrssen-Wiederholt, M., & Preiss-Weigert, A. (2012). Carryover of maduramicin from feed containing cross-contamination levels into eggs of laying hens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(28), 6946–52.
- Cronly, M., Behan, P., Foley, B., Malone, E., Shearan, P., & Regan, L. (2011). Determination of eleven coccidiostats in animal feed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry at cross contamination levels. *Analytica Chimica Acta*, 700(1-2), 26–33.
- Delahaut, P., Pierret, G., Ralet, N., Dubois, M., & Gillard, N. (2010). Multi-residue method for detecting coccidiostats at carry-over level in feed by HPLC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 27(6), 801–809.
- Dorne, J. L. C. M., Fernández-Cruz, M. L., Bertelsen, U., Renshaw, D. W., Peltonen, K., Anadon, A., Feil, A., Sanders, P., Wester, P., Fink-Gremmels, J. (2013). Risk assessment of coccidostatics during feed cross-contamination: Animal and human health aspects. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 270, 196–208.
- Henri, J., Maurice, R., Postollec, G., Dubreil-Cheneau, E., Roudaut, B., Laurentie, M., & Sanders, P. (2011). Comparison of the oral bioavailability and tissue disposition of monensin and salinomycin in chickens and turkeys. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 35(1), 73–81.
- Kennedy, D. G., Hughes, P. J., & Blanchflower, W. J. (1998). Ionophore residues in eggs in Northern Ireland: incidence and cause. *Food Additives and Contaminants*, 15(5), 535–41.

- Kouba, R. F., Craine, E. M., & Ray, W. H. (1972). Presence of residues in eggs laid by chickens receiving decoquinat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20(3), 589–592.
- Moretti, S., Fioroni, L., Giusepponi, D., Pettinacci, L., Saluti, G., & Galarini, R. (2013). Development and Validation of a Multiresidue Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Method for 11 Coccidiostats in Feed. *Journal of AOAC International*, 96(6), 1245–1257.
- Nose, N., Hoshino, Y., Kikuchi, Y., Masaki, H., Horie, S., & Kawauchi, S. (1982). Residues of synthetic antibacterial feed additives in tissues and eggs of chickens. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 23, 246–252.
- Olejnik, M., Szprengier-Juszkiewicz, T., & Jedziniak, P. (2009). Multi-residue confirmatory method for the determination of twelve coccidiostats in chicken liver using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, 1216(46), 8141–8.
- Olejnik, M., Szprengier-Juszkiewicz, T., & Jedziniak, P. (2010). Confirmatory Method for Determination of Coccidiostats in Eggs. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 54, 327-333.
- Seman, D. H., Catherman, D. R., Matsui, T., Hayek, M. G., Batson, D. B., Cantor, A. H., Tucker, R.E., Muntifer, R.B., Westendorf, M.L., Mitchell, G. E. (1989). Metabolism of decoquinat in chickens and Japanese quail. *Poultry Science*, 68(5), 670–675.
- Varenina, I., Bilandžić, N., Cvetnić, L., Kos, B., Božić, Đ., Solomun Kolanović, B., & Cvetnić, Ž. (2015). Deposition and depletion of maduramicin residues in eggs after oral administration to laying hens determined by LC-MS. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 32, 324-332.
- Vincent, U., Ezerskis, Z., Chedin, M., & von Holst, C. (2011). Determination of ionophore coccidiostats in feeding stuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Part II. Application to cross-contamination levels and non-targeted feed. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54(3), 526–34.

6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

6.1. Udział w projektach badawczych

7. Program Ramowy Komisji Europejskiej, Industry-Academia Partnerships and Pathways

Projekt 230667: Development of a unique means of detecting and proving illegal administration of recombinant somatotropin in dairy cows, 2009-2013

Wykonawca

Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, program luventus Plus

Projekt IP 2011 020371: Wieloskładnikowa metoda oznaczania pozostałości leków przeciwzapalnych w żywności, 2011-2012

Wykonawca

Narodowe Centrum Nauki, program SONATA

Projekt 2012/07/D/NZ7/03387: Badania nad wpływem metabolizmu salinomycyny na jej toksyczność, 2013-2017

Kierownik

Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, program Iuventus Plus

Projekt IP 2012 031172: Wieloskładnikowa metoda oznaczania pozostałości leków przeciwpasożytniczych w mleku kozim i owczym oraz wybranych produktach mleczarskich, 2013-2014

Wykonawca

Narodowe Centrum Nauki, program PRELUDIUM

Projekt 2015/17/N/NZ7/04105: Biotransformacja i zanikanie pozostałości kwasu acetylosalicylowego i kwasu salicylowego w tkankach i jajach kur, 2016-2018

Opiekun naukowy

Narodowe Centrum Nauki, program PRELUDIUM

Projekt 2015/17/N/NZ7/04097: Badania *in simulacra* nad rozkładem barwników azowych oraz identyfikacja ich kancerogennych metabolitów, 2016-2018

Opiekun naukowy

6.2. Działalność publikacyjna

Opracowanie metod oznaczania kokcydiostatyków, leków przeciwzapalnych i przeciworobaczych w żywności pochodzenia zwierzęcego

W związku z wprowadzeniem w 2003 roku Krajowego Programu Badań Kontrolnych Pozostałości Chemicznych, Biologicznych i Leków, Zakład Farmakologii i Toksykologii PIWet-PIB, będący krajowym laboratorium referencyjnym, został zobowiązany do opracowania i wdrożenia wielu nowych metod. Konieczne było uwzględnienie wszystkich grup związków, których kontrola jest wymagana w Unii Europejskiej.

Jako doktorantka, a następnie pracownik w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii, zostałam włączona do tych badań, co zaowocowało opracowaniem następujących metod:

- oznaczania pozostałości 12 kokcydiostatyków w wątrobie zwierząt – do dziś jest to jedyna na świecie opublikowana metoda oznaczania kokcydiostatyków w tej matrycy;
- oznaczania pozostałości 12 kokcydiostatyków w jajach;
- oznaczania pozostałości 8 benzoimidazoli, ich metabolitów i lewamizolu w mleku;
- oznaczania pozostałości 9 niesteroidowych leków przeciwzapalnych w mięśniach zwierząt – zawiera w swym zakresie fenylobutazon i oksyfenylobutazon, co okazało się szczególnie istotne w roku 2013, kiedy po ujawnieniu przypadków fałszowania wołowiny mięsem końskim instytucje UE nakazały przebadanie

– dodatkowych próbek koniny pod kątem występowania w nich niedozwolonych pozostałości fenylobutazonu i jego metabolitu;

- oznaczania pozostałości metabolitów metamizolu w mięśniach;
- jednoczesnego oznaczania pozostałości 20 niesteroidowych i 5 steroidowych leków przeciwzapalnych w mięśniach zwierząt;
- oznaczania pozostałości makrocyclicznych laktonów w mleku.

Optymalizacja warunków detekcji, rozdziału chromatograficznego i sposobu przygotowania próbek była żmudnym procesem, poprzedzonym dogłębnym przestudiowaniem piśmiennictwa naukowego. Szczególnie ważnym etapem było właściwe oczyszczenie ekstraktu, ponieważ skład próbki ma ogromny wpływ na uzyskiwane wyniki. Warunki analityczne zostały dostosowane do właściwości fizykochemicznych badanych leków oraz rodzaju matrycy. Staraliśmy się przy tym uwzględnić kwestię koszty- i pracochłonności procedur.

Wszystkie powyższe metody zostały opracowane i zwalidowane zgodnie z europejskimi wymaganiami i pozwalają oznaczać badane związki na poziomie prawnych limitów. W miarę możliwości potwierdzaliśmy ich wiarygodność także poprzez udział w badaniach biegłości. Większość metod jest do dzisiaj stosowana w realizacji programu badań kontrolnych w Polsce.

Efekt matrycy jako nowy parametr walidacyjny w metodach LC-MS/MS

Istotnym zagadnieniem w mojej pracy naukowej było opisanie charakterystycznego dla techniki LC-MS/MS zjawiska efektu matrycy. Polega ono zakłóceniu procesu jonizacji analitów przez obecne w próbce interferujące cząsteczki i skutkuje problemami zarówno w analizie jakościowej (obniża czułość metody), jak i ilościowej (może zarówno zawyżać, jak i zaniżać wyniki).

Na przykładzie metody oznaczania pozostałości niesteroidowych leków przeciwzapalnych w mięśniach zbadaliśmy wpływ efektu matrycy na wiarygodność wyników. Do badań wybraliśmy właśnie tę metodę, ponieważ ekstrakty z próbek mięśni zawierają dużo związków interferujących, a proces hydrolizy enzymatycznej, konieczny dla prawidłowego oznaczenia leków przeciwzapalnych, dodatkowo zwiększa zawartość składników matrycy w końcowym ekstrakcie.

Określiśmy różnice w efekcie matrycy w analizie próbek mięśni różnych gatunków zwierząt (bydła, trzody, koni, drobiu) oraz wpływ konstrukcji źródła jonów spektrometru mas na opisywane zjawisko. Wyniki mają istotne znaczenie praktyczne, ponieważ pozwalają określić odporność metod na czynniki takie jak rodzaj próbki i zastosowana aparatura.

Co ważne, na podstawie przeprowadzonych badań i istniejących zaleceń dla metod bioanalitycznych, zaproponowaliśmy kryterium oceny efektu matrycy w analizie pozostałości leków weterynaryjnych w żywności. Ponieważ niepowtarzalność badanego zjawiska jest poważniejszym problemem niż sama jego skala, za parametr

określający przydatność metody uznaliśmy rozrzut efektu matrycy, a jako kryterium zaproponowaliśmy wartość współczynnika zmienności poniżej 25%.

Zanikanie pozostałości leków przeciwzapalnych w mleku oraz identyfikacja ich metabolitów

Ważnym tematem naszych badań była kwestia zanikania w mleku leków przeciwzapalnych dozwolonych do stosowania u krów mlecznych. Przeprowadzone przez nasz zespół doświadczenie potwierdziło wcześniejsze wyniki w zakresie przechodzenia meloksykamu do mleka oraz czasu utrzymywania się jego pozostałości w tej matrycy. Przebadaliśmy również stopień przechodzenia fluniksyny i meloksykamu do produktów mleczarskich takich jak masło, śmietana, ser.

Jednak najciekawsze wyniki dotyczyły oznaczania fluniksyny oraz jej metabolitów w mleku po doświadczalnym podaniu fluniksyny krowom. Wiadomo, że głównym metabolitem fluniksyny i jej pozostałością markerową w mleku jest 5-hydroksyfluniksyna, kontrowersje budziło jednak powstawanie i przechodzenie do mleka jej metabolitu II fazy – glukuronianu fluniksyny.

W naszych badaniach porównaliśmy stężenia fluniksyny w mleku od krów doświadczalnych przy zastosowaniu dwóch metod analitycznych – uwzględniającej hydrolizę enzymatyczną i pozbawionej tego etapu. W ten sposób udowodniliśmy wysoki stopień wiązania fluniksyny z kwasem glukuronowym (ok. 73%). Jednocześnie, poprzez zastosowanie techniki spektrometrii mas typu pułapka jonowa zidentyfikowaliśmy w mleku związek o masie molowej odpowiadającej glukuronianowi fluniksyny oraz o widmie mas zbieżnym z fragmentacją leku macierzystego. Jest to pierwszy bezpośredni dowód obecności glukuronianu fluniksyny w mleku.

Zapewnienie jakości badań w laboratorium

Wewnętrzne i zewnętrzne sterowanie jakością pozwala zapewnić wiarygodność wyników w laboratorium akredytowanym. Ważne jest, aby próbki kontrolne były jak najbardziej zbliżone do próbek badanych. Powinno się zatem, w miarę możliwości, stosować próbki z naturalnie wbudowanymi pozostałościami (po podaniu leku zwierzętom); zazwyczaj ich źródłem są (certyfikowane) materiały referencyjne lub badania biegłości.

Niestety, często takie próbki nie są komercyjnie dostępne. Dlatego w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii wyprodukowaliśmy oraz szczegółowo przebadaliśmy materiały referencyjne zawierające naturalnie wbudowane pozostałości: 5-hydroksyfluniksyny w mleku oraz nikarbazyny i narazyny w jajach. Oba materiały zostały przygotowane w formie liofilizowanej, co zwiększa ich trwałość. Badania jednorodności i stabilności wykazały przydatność materiałów w sterowaniu jakością, a badania międzylaboratoryjne w europejskich laboratoriach referencyjnych pozwoliły bardziej wiarygodnie oszacować wartość przypisaną.

Ze względu na wspomniane trudności z uzyskaniem próbek z naturalnie wbudowanymi pozostałościami, bardzo cenne są doświadczenia z każdego badania biegłości. W jednym z testów przygotowanych przez Central Science

Laboratory (program FAPAS 0270) organizator popełnił istotny błąd na etapie planowania, a my jako uczestnicy tych badań, podjęliśmy się analizy przyczyn i konsekwencji tego niedopatrzenia.

Badania dotyczyły oznaczania pozostałości oksfendazolu i jednego z jego metabolitów – sulfonu fenbendazolu. Organizator nie przewidział, że w próbce może być obecny także drugi metabolit – fenbendazol. Ponieważ część uczestników zastosowała metodę, w której wszystkie metabolity oksfendazolu oznaczane są jednocześnie, ich wyniki znacznie odbiegały od tych uzyskanych przez pozostałe laboratoria. Popelniony przez organizatora błąd sprawił, że wynik zależał od zastosowanej metody, co znacznie obniżyło przydatność tych badań biegłości w sterowaniu jakością.

Owoce powyższych badań jest 19 publikacji w czasopismach z listy JCR (26 łącznie z osiągnięciem habilitacyjnym). Pełen wykaz publikacji stanowiących dorobek naukowy znajduje się w załączniku 4 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego. Poniżej przedstawiona jest analiza bibliometryczna dorobku naukowego (stan na 31 grudnia 2015 roku).

Liczba publikacji w czasopismach z listy JCR	26
w tym: opublikowanych po uzyskaniu stopnia naukowego doktora	23
w tym: stanowiących osiągnięcie habilitacyjne	7
Liczba publikacji w czasopismach spoza listy JCR	2
Liczba cytowań (bez autocytowań) wg Web of Science	132
Indeks Hirscha wg Web of Science	5
Sumaryczny współczynnik wpływu (IF, impact factor)	48,4
w tym: dla publikacji opublikowanych po uzyskaniu stopnia naukowego doktora	46,6
w tym: dla publikacji stanowiących osiągnięcie habilitacyjne	13,1
Suma punktów MNiSW	579
w tym: dla publikacji opublikowanych po uzyskaniu stopnia naukowego doktora	557
w tym: dla publikacji stanowiących osiągnięcie habilitacyjne	188
Liczba komunikatów konferencyjnych (konferencje międzynarodowe)	33
Liczba komunikatów konferencyjnych (konferencje krajowe)	25

6.3. Działalność organizacyjna

- Od 2014 roku jestem wiceprzewodniczącą oddziału lubelskiego Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego. Biorę czynny udział w organizacji XII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego, który planowany jest na wrzesień 2017 roku.

- Jestem liderką pakietu zadań WP4: „Training activities” w projekcie VET-TWIN (692131): „Strengthening of scientific excellence of the National Veterinary Research Institute in animal health and food chain safety”, który uzyskał finansowanie w ramach akcji Coordination & support action Programu Horizon 2020 Komisji Europejskiej. Miałam znaczący wkład w merytoryczne przygotowanie wniosku projektowego. Uczestniczyłam w dyskusjach na temat celów projektu, opracowałam założenia umożliwiające ich realizację i harmonogram zadań.
- Jestem autorką lub współautorką 7 procedur badawczych stosowanych w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii w badaniach kontrolnych i usługowych oraz 6 instrukcji analitycznych przekazanych laboratoriom Zakładów Higieny Weterynaryjnej.

6.4. Działalność dydaktyczna i popularyzująca naukę

- Pełniłam funkcję promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim dr Marty Piątkowskiej. Publiczna obrona rozprawy doktorskiej pt. „Pozostałości leków weterynaryjnych, kokcydiostatyków i barwników w jajach – aspekty analityczne i toksykologiczne” odbyła się 18 września 2015 roku, a stopień doktora nauk weterynaryjnych został doktorantce przyznany na 168. posiedzeniu Rady Naukowej PIWet-PIB 25 listopada 2015. Osiągnięcia doktorantki zostały bardzo wysoko ocenione przez recenzentów rozprawy.
- W ramach współpracy ze Szkołą Główną Gospodarstwa Wiejskiego prowadziłam dwukrotnie, w roku 2013 i 2014, zajęcia dla studentów anglojęzycznych Wydziału Weterynaryjnego w ramach ćwiczeń z przedmiotu „Feed hygiene”.
- Wraz z innymi pracownikami Zakładu Farmakologii i Toksykologii prowadziłam szkolenie dla pracowników Państwowego Naukowo-Badawczego Instytutu Kontroli Produktów Weterynaryjnych i Dodatków Paszowych (SCIVP) we Lwowie w zakresie metod instrumentalnych stosowanych w badaniach urzędowych pasz.
- Wielokrotnie prowadziłam lub współprowadziłam szkolenia dla pracowników rutynowych laboratoriów urzędowych (Zakładów Higieny Weterynaryjnej). Zakres tematyczny tych szkoleń obejmował metody przekazywane laboratoriom rutynowym przez Krajowe Laboratorium Referencyjne (PIWet-PIB) oraz zagadnienia dotyczące pracy w laboratorium akredytowanym (walidacja metod, sterowanie jakością).
- Wielokrotnie recenzowałam publikacje dla czasopism naukowych z listy JCR (Analytica Chimica Acta, Journal of Chromatography A, Food Additives and Contaminants Part A, Food Analytical Methods, Journal of Dairy Science, Journal of Separation Science, Journal of Veterinary Science).

Małgorzata Olejnik