

AUTOREFERAT

Agata Bielawska-Drózd

Wojskowy Ośrodek Medycyny Prewencyjnej, Modlin

2019

Spis treści

1. Imię i nazwisko.....	1
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej.....	1
3. Informacje o przebiegu pracy zawodowej, w tym naukowej.....	1
4. Wskazanie osiągnięć wynikających z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)	
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego.....	2
4.1.1. Wykaz autorskich publikacji z listy JCR (posiadających Impact Factor) stanowiących osiągnięcia naukowe.....	2
4.1.2. Wykaz autorskich publikacji bez wskaźnika wpływu, stanowiących osiągnięcia naukowe istotne dla omawianego obszaru jednotematycznego mojej specjalności.....	2
4.1.3. Omówienie celu naukowego przedstawionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem osiągnięć naukowych.....	5
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych (nie wchodzących w skład osiągnięć naukowych, o których mowa w art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.).....	18

1. Imię i nazwisko

mjr dr n. biol. Agata Bielawska-Drózd

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

Dyplom doktora nauk biologicznych w specjalności mikrobiologia. Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii w Warszawie, czerwiec 2006 r.

Tytuł rozprawy doktorskiej: "Wykrywanie i identyfikacja *Bacillus anthracis* w próbkach środowiskowych".

Promotor: płk w st. spocz. prof. dr hab. n. wet. Michał Bartoszcze

Recenzenci: płk w st. spocz. prof. dr hab. n. wet. Jerzy Mierzejewski

pplk SG prof. dr hab. n. med. Józef P. Knap

Dyplom ukończenia studiów wyższych magisterskich na kierunku Biologia, specjalność Mikrobiologia, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, czerwiec 1995.

Tytuł pracy magisterskiej: Porównanie i ocena wybranych metod analitycznych stosowanych do ilościowego oznaczania dekstranu.

Promotor: prof. dr hab. n. biol. Janusz Szczodrak

Recenzent: prof. dr hab. n. biol. Jerzy Ilczuk

3. Informacje o przebiegu pracy zawodowej, w tym naukowej

1995-1997 r. Nadwiślańskie Zakłady Przetwórstwa Owocowo-Warzywnego „Leonard” (NZPOW) w Zagłobie – kierownik Laboratorium Kontroli Jakości.

1997-2004 r. Ośrodek Diagnostyki i Zwalczania Zagrożeń Biologicznych Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii (WIHiE) w Puławach – asystent.

2000-2001 r. Institute of Molecular Biology and Medicine, University of Scranton, Pennsylvania, USA – staż w ramach stypendium naukowego Agencji i Zaawansowania

Projektów Badawczych w Obszarze Obronności DARPA (Defense Advanced Research Projects Agency).

2004-2005 r. JW 4111, 74 Batalion Przeciwepidemiczny w Warszawie – oficer Zespołu Medycyny Prewencyjnej.

2005-2006 r. Centrum Reagowania Epidemiologicznego Sił Zbrojnych RP (CRESZ RP) w Warszawie – oficer Zespołu Rozpoznania Biologicznego (ZRB)

2006-2018 r. Ośrodek Diagnostyki i Zwalczania Zagrożeń Biologicznych Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii (WIHiE) Puławy – specjalista, kierownik Pracowni Bakteriologii

Od 2018 r. – Wojskowy Ośrodek Medycyny Prewencyjnej Modlin – szef Sekcji Rozpoznania Biologicznego w Zespole Reagowania Epidemiologicznego.

4. Wskazanie osiągnięć wynikających z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego:

"Doskonalenie metod detekcji, genetycznej identyfikacji, różnicowania wybranych czynników broni biologicznych (*Bacillus anthracis*, *Vibrio cholerae*, enterokrwotoczne *E. coli*, *Coxiella burnetii* i *Francisella tularensis*) oraz rozpoznanie ich rezerwuarów".

Osiągnięcie naukowe stanowi jednoobszarowy cykl publikacji z moim znaczącym udziałem, wydanych w latach 2007-2018.

4.1.1. Wykaz autorskich publikacji z listy JCR (posiadających Impact Factor) stanowiących osiągnięcia naukowe:

1. **Bielawska-Drózd A** [autor korespondencyjny], Niemcewicz M, Bartoszcze M. The evaluation of methods for detection of *Bacillus anthracis* spores in artificially contaminated soil samples. *Pol J Environ Stud.* 2008;17(1):5-10.

IF₂₀₀₈ 0,963 pkt MNiSW: 13

2. **Bielawska-Drózd A** [autor korespondencyjny], Cieślik P, Bartoszcze M, Mirski T, Osek J, Gryko R. Detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* by triplex real-time PCR method. *Bull Vet Inst Pulawy*. 2011;55:635-639.

IF₂₀₁₁ 0,414 pkt MNiSW: 20

3. **Bielawska-Drózd A** [autor korespondencyjny], Mirski T, Bartoszcze M, Cieślik P, Roszkowiak A, Michalski A. Development of real-time PCR assay for detection of *Vibrio cholerae*. *Pol J Environ Stud*. 2012;21(2):277-286.

IF₂₀₁₂ 0,462 pkt MNiSW: 15

4. **Bielawska-Drózd A** [autor korespondencyjny], Cieślik P, Mirski T, Gawel J, Michalski A, Niemcewicz M, Bartoszcze M, Żakowska D, Laskowki K, Kocik J. Prevalence of *Coxiella burnetii* in environmental samples collected from cattle farms in Eastern and Central Poland (2011–2012). *Vet Microbiol*. 2014;174(3):600-606.

IF₂₀₁₄ 2,511 pkt MNiSW: 40

5. Cieślik P, Knap J, Kołodziej M, Mirski T, Joniec J, Graniak G, Żakowska D, Winnicka I, **Bielawska-Drózd A**. Real-Time PCR Identification of Unique *Bacillus anthracis* Sequences. *Folia Biol (Praha)*. 2015;61:178-183.

IF₂₀₁₄ 0,833 pkt MNiSW: 20

6. **Bielawska-Drózd A** [autor korespondencyjny], Cieślik P, Żakowska D, Głowacka P, Wlizło-Skowronek B, Zięba P, Zdun A. Detection of *Coxiella burnetii* and *Francisella tularensis* in tissues of wild-living animals and in ticks of north-west Poland. *Pol J Microbiol*. 2018;67(4):529-534.

IF₂₀₁₈ 0,784 pkt MNiSW: 15

7. Cieślik P, Knap JP, Piechowicz L., **Bielawska-Drózd A** [autor korespondencyjny]. Subspecies differentiation and genotyping of *Francisella tularensis* strains isolated from clinical and environmental samples. *Lett Appl Microbiol*. 2018;67(6):550-555.

IF₂₀₁₈ 1,471 pkt MNiSW: 20

4.1.2. Wykaz autorskich publikacji bez wskaźnika wpływu, stanowiących osiągnięcia naukowe istotne dla omawianego obszaru jednotematycznego mojej specjalności:

8. **Bielawska-Drózd A** [autor korespondencyjny], Bartoszcze M. Występowanie przetrwalników *Bacillus anthracis* w środowisku. *Med Weter.* 2007;63(8):946-950.
pkt MNiSW: 9
9. **Bielawska-Drózd A** [autor korespondencyjny], Niemcewicz M, Gawel J, Bartoszcze M, Graniak G, Joniec J, Kołodziej M. Identyfikacja *Francisella tularensis* techniką real-time PCR z wykorzystaniem sond hybrydujących zaprojektowanych dla fragmentów sekwencji genów *fopA* i *tul4*. *Med Dosw Mikrobiol.* 2010;62:351-360.
pkt MNiSW: 9
10. **Bielawska-Drózd A** [autor korespondencyjny], Gawel J, Bartoszcze M, Kołodziej M, Graniak G, Joniec J, Michalski A. Identyfikacja pałeczki tularemii techniką PCR w czasie rzeczywistym przy użyciu sond hydrolizujących. *Lek Wojsk.* 2011;89(2):98-102.
pkt MNiSW: 5
11. **Bielawska-Drózd A** [autor korespondencyjny], Cieślik P, Wlizło-Skowronek B, Zięba P, Pitucha G, Gawel J, Knap J. Studies on the occurrence of *Coxiella burnetii* infection in ticks in selected eastern and central regions of Poland. *J Microbiol Biotechnol Food Sci.* 2016;5(4):355-357.

Osiągnięcie naukowe będące podstawą do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego stanowi cykl siedmiu publikacji naukowych opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports i czterech oryginalnych publikacji naukowych bez współczynnika wpływu. Sumaryczny IF dla cyklu prac stanowiących osiągnięcie naukowe wynosi 7,435 IF, natomiast sumaryczna liczba punktów MNiSW – 166. W dziewięciu z jedenastu publikacjach jestem pierwszym autorem, w dziesięciu jestem autorem korespondencyjnym.

W dalszej części autoreferatu prace wchodzące w skład przedstawionego do oceny cyklu są przywoływane jako **P.1-P.11.**

4.1.3. Omówienie celu naukowego przedstawionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem osiągnięć naukowych

Badania dotyczące opracowania skutecznych metod szybkiej detekcji i identyfikacji szczególnie niebezpiecznych czynników biologicznych wpisujących się w panel bioterrorystycznych, prowadzę od 2004 roku. Problematyka ta jest szczególnie ważna z uwagi na możliwość użycia niektórych z tych drobnoustrojów, jak np.: *Bacillus anthracis*, *Vibrio cholerae*, enterokrwotoczne izolaty *E. coli* – EHEC, *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis* w atakach bioterrorystycznych. Konsekwencjami ataku mogą być zachorowania ludzi i zwierząt, zgony, panika oraz dezorganizacja życia i skażenie środowiska na danym obszarze. Najgroźniejszą formą ataku jest użycie aerozolu biologicznego. Tak np. rozpylenie nad aglomeracją miejską 100 kg przetrwalników *B. anthracis* może spowodować straty od 1 do 3 mln osób. W związku z tym istnieje potrzeba ustawicznego doskonalenia metod wykrywania tego typu zagrożeń. Skutki niewykrytego w porę ataku biologicznego ujawniają się po pewnym czasie, co ogranicza możliwości minimalizowania strat ludzkich. Od lat rozwijane są coraz nowocześniejsze techniki detekcyjne, pozwalające wykryć obecność czynników biologicznych w powietrzu, co stwarzałoby szansę zastosowania środków ochronnych (Bartoszcze 2003). Atak bioterrorystyczny może być przeprowadzony z użyciem skażonej żywności, wody, w postaci przesyłek pocztowych, jak i w inny, niekonwencjonalny sposób (kosmetyki). Stąd też istnieje potrzeba przygotowania czułych i szybkich metod wykrywania zagrożeń. Jedną z czołowych metod detekcyjnych jest luminometria, oparta na wykrywaniu cząsteczek wysokoenergetycznego ATP, co pozwala na wykrycie obecności żywych czynników biologicznych (Bartoszcze, Bielawska 2000). W badaniach własnych technika ta została zaadaptowana do wykrywania przetrwalników laseczki wąglika w różnych środowiskach, w próbkach wymazowych (incydenty kopertowe z „białym proszkiem”), w próbkach powietrza. Technika opiera się na procedurze „heat shock” (germinacja przetrwalników w temp. 62,5°C. w obecności 10mM L-alaniny i 2 mM adenozyne), umożliwiając wykrywalnie spor *B. anthracis* na poziomie 29,300 przetrwalników. Zaletą tej metody jest jej szybkość oraz niski koszt oznaczania, co czyni z niej metodę do szerokiego rozpowszechniania w praktyce. Wyniki prac doświadczalnych zostały zaprezentowane podczas konferencji naukowych, zamieszczone w pracach opublikowanych częściowo w czasopiśmie przed obroną pracy doktorskiej (zał. 4, II.D.26,27,30,31,32,33,34,35). Po obronie doktoratu kontynuowałam badania nad wykorzystaniem techniki luminometrii do wykrywania zanieczyszczeń

mikrobiologicznych, szczególnie w wodzie, do jej monitorowania, co ma duże znaczenie dla bezpieczeństwa ludności, gdyż mikroorganizmy mogą być użyte do ataku również poprzez zanieczyszczoną wodę (zał. 4, II.D.34,35).

W wielu przypadkach standardowe metody diagnostyczne oparte na hodowlach, preparatyce mikroskopowej czy analizie biochemicznej nie mogą być preferowane w identyfikacji czynników z uwagi na długi czas konieczny do uzyskania wyników. Uzasadnione staje się wdrażanie stosunkowo szybkich, a przy tym precyzyjnych i powtarzalnych metod genetycznych, opartych na wykrywaniu specyficznych dla danego gatunku drobnoustroju sekwencji nukleotydowych. W tym celu stosuje się metody w oparciu o łańcuchową reakcję polimerazową (PCR). Wśród nich możemy wyróżnić m.in. technikę nested PCR, PCR-ELISA, multiplex PCR, VNTR PCR, long-range PCR, rep-PCR, AFLP, RFLP, PFGE i szereg innych odmian.

W cyklu przeprowadzonych przeze mnie prac opracowane zostały metody wykrywania powyższych czynników biologicznych w oparciu o technikę łańcuchowej reakcji polimerazy w tym real-time PCR (PCR czasu rzeczywistego). Dla podniesienia specyfiki, czułości i ograniczenia czasu trwania reakcji zaprojektowano zestawy oligonukleotydów (starterów i sond molekularnych) wykorzystujących zarówno aktywność 5'-3' egzonukleazową (TaqMan probes) polimerazy *Taq* (enzym wyizolowany z bakterii *Thermus aquaticus*), jak i opartych na zjawisku Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) – sondy typu HybProbes. Zaproponowano i wdrożono kompleksowe wykrywanie sekwencji nukleotydowych w reakcjach multipleksowych, a także dobrano algorytmy sekwencyjnej identyfikacji czynników biologicznych na poziomie gatunku, podgatunku oraz zjadliwości badanych izolatów.

Dobór sekwencji markerowych przeprowadzono poprzez wytypowanie genów umożliwiających dyskryminację spokrewnionych szczepów, np. geny kodujące białka niezbędne do podstawowych procesów życiowych (tzw. housekeeping genes); mniej podatne na presję selekcyjną, a charakteryzujące się wysoką zmiennością sekwencje międzygenowe (intergenic sequences – IS) czy geny odgrywające ważną rolę w procesie patogenezy. Startery i sondy dla wybranych sekwencji genów markerowych zaprojektowano przy użyciu programu LightCycler Probe Design 2.0 (Roche, Polska). Do standaryzacji parametrów starterów i sond wykorzystywano programy Oligo Analyzer (Integrated DNA Technologies, Inc., USA) oraz Fixed Oligos. Zaprojektowane sekwencje oligonukleotydowe poddawano analizie z zastosowaniem oprogramowania *in-silico* PCR (<http://insilico.ehu.es/PCR/>) wobec zdeponowanych w bazie danych genomów szczepów badanego drobnoustroju. Otrzymane

produkty amplifikacji porównywano w programie Clustal Omega (<https://www.embl.de/>) celem sprawdzenia homologii zaprojektowanych starterów i sond z sekwencjami markerowymi. Dodatkowo przeprowadzano analizę porównawczą starterów oraz otrzymanych produktów PCR (amplikonów) za pomocą algorytmu BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.chi>). W efekcie optymalizacji reakcji nie stwierdzono żadnego podobieństwa powstałych produktów amplifikacji z innymi przedstawicielami panelu szczepów kontrolnych blisko spokrewnionych ani reakcji krzyżowych wobec zaprojektowanych oligonukleotydów.

Cykl prac nad optymalizacją detekcji i identyfikacji molekularnej rozpoczął od laseczki wąglika *Bacillus anthracis* należącej do „grupy *Bacillus cereus*”. Charakteryzuje ją wysokie podobieństwo genetyczne, utrudniające ścisłe rozróżnienie gatunków *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus weihenstephanensis* i *Bacillus pseudomycoides*. Szczególnie wiele trudności sprawia różnicowanie *B. thuringiensis*, *B. cereus* i *B. anthracis* z powodu możliwości horyzontalnego transferu genów między tymi bakteriami (m.in. poprzez zachodzenie pełnego cyklu rozwojowego bakterii glebowych podczas kiełkowania przetrwalników w sprzyjających warunkach środowiskowych – odpowiednia wilgotność, pH (zasadowe), obecność różnych składników odżywczych i jonów: Ca^{2+} i Mg^{2+} (Van Ness 1971). Transfer genów może odbywać się poprzez przemieszczanie się ruchomych elementów wysp patogenności, przez przesunięcie całych (pełnych) plazmidów, bądź z udziałem bakteriofagów CP-51 w procesie transdukcji lub za pośrednictwem transpozonów np. Tn 4430 plazmidu transferowego – pXO12 *B. thuringiensis* (Helgason i wsp. 2000, Ellerbrok i wsp. 2002; Pepper, Gentry 2002). Potwierdzeniem zachodzących w glebie zmian genetycznych jest obecność tzw. szczepów przejściowych *Bacillus sp. Ba813*⁺ (Ramisse i wsp. 1999). Zjawisko transferu genów może powodować trudności diagnostyczne. Według niektórych autorów mają miejsce przypadki nabycia przez *B. cereus* cech zjadliwości charakterystycznych dla *B. anthracis* (Hofmaster i wsp. 2004). Dochodzić może także do utraty plazmidów pXO1 lub pXO2 przez laseczkę wąglika (Pannucci i wsp. 2002).

W badaniach własnych w pracy (P.8) po raz pierwszy podjęto próbę wykrywania spor *B. anthracis* w glebie, w próbkach pochodzących z miejsc o podwyższonym ryzyku, takich jak tereny zalewowe i grzebowiska padłych na węglík zwierząt hodowlanych w woj. lubelskim, świętokrzyskim i podlaskim. Wykorzystano oligonukleotydy zorientowane na sekwencje chromosomalne *Ba813*⁺ oraz plazmidowe przy użyciu metody nested PCR (P.1). W badaniach wykryto izolaty *Ba813*⁺ określane jako szczepy przejściowe,

które według danych literaturowych często zasiedlają miejsca, w których doszło do upadku zwierząt chorych na węglik ((Ramisse i wsp. 1999).

Po raz pierwszy w Polsce zbadana została miazga zębowa krowy padłej na węglik (Zakrzów, woj. lubelskie). Wykazano w niej obecność zarówno sekwencji chromosomalnej *Ba813*⁺ jak i genu *cap* występującego na plazmidzie pXO2. Obecność jednego plazmidu może świadczyć o utracie drugiego, w tym przypadku pXO1. W literaturze światowej donoszono o podobnych przypadkach izolacji *B. cereus*, szczep G9241, posiadającego plazmid pXO1, wykazującego aż 99,6% podobieństwa z plazmidem pXO1 *B. anthracis*. Mimo że nie posiadał plazmidu pXO2 świadczącego o pełnej zjadliwości, powodował 100% śmiertelność zakażonych myszy (Hoffmaster i wsp. 2004). Plazmidy będące jednocześnie nośnikami genów zjadliwości *B. anthracis* mogą ulegać mutacjom lub nawet utracie, co z kolei może powodować nieskuteczną identyfikację *B. anthracis* przy wyłącznym oparciu o geny plazmidowe. (Ellerbrok i wsp. 2002). Taka sytuacja skłania do poszukiwania sekwencji chromosomalnych charakterystycznych dla gatunku *B. anthracis*. W dotychczasowych badaniach koncentrowano się głównie na takich markerach chromosomalnych, jak: *Ba813*, *SG-850*, gen *wrrA*, gen *rpoB* kodujący podjednostkę β pentametrycznej polimerazy RNA, gen *gyrA* (kodujący podjednostkę A gyrazy), *Ba5510*, jednak w świetle niektórych badań sekwencje te mogą występować także u innych przedstawicieli „grupy *Bacillus cereus*” (Ellerbrok i wsp. 2002; Bode i wsp. 2004). Z obecnie badanych markerów chromosomalnych najbardziej obiecujące wydają się być sekwencje genów kodujących hipotetyczne białka: *BA3206* (Bode i wsp. 2004) oraz *BA5345* (Ellerbrok i wsp. 2002; Antwerpen i wsp. 2008). W badaniach własnych opracowano zestaw oligonukleotydów specyficznych dla unikatowej sekwencji chromosomalnej *BA5345* (kodującego białko hipotetyczne), co pozwoliło na skuteczne rozróżnianie blisko ze sobą spokrewnionych gatunków drobnoustrojów z „grupy *Bacillus cereus*”. Ze względu na wysoki stopień konserwatywności proponowanej sekwencji, uzasadnione jest stosowanie jej w pierwszej kolejności jako markera chromosomalnego dla wykrywania gatunku *B. anthracis*. W kolejnym etapie opracowywania schematu diagnostycznego z użyciem metody PCR czasu rzeczywistego określono zjadliwość mikroorganizmu, wskazując na obecność sekwencji plazmidowych *B. anthracis* (pXO1 i pXO2) – genu *pag* kodującego białko ochronne (komponent toksyny węglikowej) zlokalizowanego na plazmidzie pXO1 i genu *cap* kodującego otoczkę zlokalizowanego na plazmidzie pXO2, wykorzystując zaprojektowane sondy hydrolizujące. Wyniki pracy zostały umieszczone w publikacji **P.5** oraz w streszczeniach konferencyjnych (Postępy w Medycynie Zakażeń

i na Międzynarodowej Konferencji Naukowo-Szkoleniowej, Przygotowanie Szpitali do Zdarzeń Masowych) (zał. 4, III.B.20,23).

Następnym obszarem badawczym było opracowanie algorytmu identyfikacji molekularnej toksynogennych szczepów przecinkowca cholery *Vibrio cholerae* – kolejnego czynnika o potencjale bioterrorystycznym. W tym celu dokonano wyboru specyficznej i wysoce konserwatywnej sekwencji w obrębie gatunku – genu *ompW*, który koduje białko błony zewnętrznej. Doboru pozostałych markerów *ompU* (genu kodującego białko błony zewnętrznej), *ctxA* (genu kodującego podjednostkę A toksyny cholery), *zot* (genu kodującego toksynę towarzyszącą toksynie CT – zonula occludens toxins) oraz *tcpA* (toxin coregulated pilus) dokonano na podstawie roli jaką odgrywają w patomechanizmie przecinkowca cholery. O ile gen *ompW* może służyć do identyfikacji gatunku *V. cholerae* o tyle geny *ctx* i *zot* pozwalają na odróżnienie szczepów toksynogennych (wywołujących cholerę) od nietoksynogennych. Dodatkowo gen *tcpA* umożliwia różnicowanie serotypu O1 na biotypy (El Tor lub Classical). Dla odróżnienia serogrupy O1 (dominującej w Europie) od O139 (charakterystycznej dla obszarów azjatyckich) zaproponowano zestaw starterów *rfb*-O1, *rfb*-O139. W literaturze światowej proponowany jest szeroki wachlarz dostępnych rozwiązań identyfikacji molekularnej przypisanych specyficznie regionu, z których pozyskiwane zostały izolaty przecinkowca cholery (Singh i wsp. 2002; Chkraborty i wsp. 2008; Chomvarin 2007; Fykse i wsp. 2007; Huang i wsp. 2009; Jiang i wsp. 2003; Khuntia i wsp. 2008; Nandi i wsp. 2000). W badaniach własnych użyto zaprojektowanych we własnym zakresie starterów i sond hydrolizujących dla zestawu genów białek błony zewnętrznej *ompW*, *ompU* i genu *zot*; hybrydujących dla genów toksyny cholery oraz zestawu molekularnego z interkalującym barwnikiem SYBRGreen dla genów *tcpA* i *rfb*. Specyficzność i czułość reakcji real-time PCR badano wobec 55 szczepów środowiskowych *V. cholerae* pozyskanych z rzek: Bug i Wisła, pochodzących z kolekcji własnej ODiZZB oraz 6 szczepów referencyjnych otrzymanych z Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdyni. Pomimo że dokonany wybór markerów genetycznych *V. cholerae* nie wyczerpuje pełnych możliwości diagnostycznych tego gatunku, to jednak pozwala, co jest niezwykle pezydatne przeprowadzić identyfikację do gatunku i odróżnić szczepy toksynogenne od niezdolnych do produkcji toksyn. Wyniki badań umieszczone zostały w pracy P.3.

Dla wykrywania i identyfikacji szczególnie niebezpiecznych pałeczek *coli* – enterokrwotocznych szczepów *E. coli* (EHEC) w badaniach własnych po raz pierwszy w Polsce opracowany został triplex real-time PCR z użyciem zestawów starterów i sond hydrolizujących znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi, emitujących różne długości fal

wykrywanych w trzech niezależnych kanałach detekcji. Oligonukleotydami zaprojektowanymi dla trzech markerów genetycznych były: geny dwóch podjednostek toksyny Shiga (*stx1* i *stx2*) kodowane przez geny bakteriofagowe *stx* wbudowane w chromosom bakteryjny (profag) oraz gen kodujący intiminę – białko adhezyjne, umożliwiające przyłączenie się patogennych *E. coli* do enterocytów (produkt genu *eaeA* zlokalizowanego na chromosomie bakteryjnym) (Mainil i wsp. 2005; Nataro i wsp. 1998). Wymienione czynniki zjadliwości i infekcyjności są wystarczające do określenia obecności enterokrwotocznych pałeczek *coli* obejmujących szeroką gamę serogrup w tym O157, O26, O111, O113, O145 czy O103 (Nataro i wsp. 1998; Tozzi i wsp. 2003). W związku z wysoką czułością, jak i specyficznością metody (badania przeprowadzono wobec szerokiego panelu szczepów enterokrwotocznych i patogennych pałeczek okrężnicy z kolekcji PIWet), może ona być z powodzeniem stosowana do wykrywania i identyfikacji izolatów EHEC np. w próbkach zakażonego mięsa. Wyniki pracy zostały przedstawione w publikacji **P.2**.

Kolejnym kierunkiem badań była identyfikacja molekularna czynnika etiologicznego gorączki Q – *C. burnetii* (obligatoryjny patogen wewnątrzkomórkowy). Dokonano jej w oparciu o zoptymalizowaną technikę real-time PCR z użyciem sond hydrolizujących dla sekwencji insercyjnej *IS1111*⁺ (wielokopijny gen transpozazy) (Klee i wsp. 2006). Dla podniesienia specyficzności reakcji real-time PCR amplifikowano sekwencję chromosomalną *ftsK* (jednokopijny gen kodujący podjednostkę translokazy DNA) z zastosowaniem własnych starterów i sondy hydrolizującej (**P.4**). Specyficzność reakcji przeprowadzono wobec 24 szczepów gatunków blisko i daleko spokrewnionych z *C. burnetii*. Celem badań była analiza występowania patogenu w środowisku gospodarstw rolniczo-hodowlanych, w których w ostatnich latach zdiagnozowano gorączkę Q oraz wśród zwierząt dzikich i stawonogów (kleszcze). Morfologicznie *C. burnetii* występuje w dwóch formach: SCV (small cell variant), o właściwościach zbliżonych do bakteryjnych form przetrwalnych wysoce opornych na czynniki fizyczne i chemiczne oraz LCV – metabolicznie aktywnej i wykazującej niską oporność na czynniki środowiskowe (**zal. 4, II.D.42**).

W Polsce prowadzane są badania nad gorączką Q głównie w oparciu o status immunologiczny zwierząt zarówno hodowlanych, jak i dzikich (Niemczuk i wsp. 2011; Tylewska i wsp. 1996). Nieliczne badania obejmują analizę molekularną materiału klinicznego lub środowiskowego, w tym stawonogów (Chmielewski i wsp. 2009; Tylewska i wsp. 1996). Z uwagi na wysoką infekcyjność czynnika, jak i zdolności długiego utrzymywania się w środowisku zewnętrznym istotne było sprawdzenie jego obecności w próbkach środowiskowych (wymazowych) pobranych z miejsc przetrzymywania zwierząt

hodowlanych. W badaniach przesiewowych wykorzystano 727 próbek środowiskowych pobranych z 25 gospodarstw rolniczo-hodowlanych w województwach: mazowieckim, lubelskim i podkarpackim, w których w ostatnich latach zdiagnozowano gorączkę Q przy wykorzystaniu sondy molekularnej zorientowanej na wielokopijne sekwencje *IS1111*⁺. Obecność tego genu stwierdzono wśród 4,5% badanych próbek. Wyniki dowodzą obecności czynnika w środowisku zewnętrznym, a tym samym wskazują na realne zagrożenie zakażeniem hodowców bydła. Biorąc pod uwagę tropizm patogenu do narządów rodnych, w obszarze moich badań znalazły się również próbki kliniczne w postaci wymazów z pochwy – 30 próbek). W jednej próbce pobranej od rodnej krowy stwierdzono obecność sekwencji nukleotydowych specyficznych dla pałeczki gorączki Q. Badania na obecność *C. burnetii* w próbkach środowiskowych, jak i klinicznych zostały przeprowadzone w Polsce po raz pierwszy. Spośród *IS1111*⁺ pozytywnych próbek poddanych hodowli na linii komórkowej BGM *in vitro* z dwóch namnożono izolaty *C. burnetii*. Ciekawe jest, że próbki do badań pobrane były z losowo wybranych gospodarstw hodowlanych, w których wcześniej nie stwierdzono w badaniach serologicznych ognisk epidemiologicznych. W świetle powyższych badań uzasadniona była szersza analiza molekularna pozyskanych izolatów metodą MST (Multispacer Typing) oparta na sekwencjonowaniu fragmentów międzygenowych (ang. Intergenic Spacers), które wykazują wysoką zmienność. Dokonano wyboru 6 z 10 zaproponowanych sekwencji międzygenowych dyskryminujących poszczególne profile MST *C. burnetii* opisane wcześniej przez Glazunową i wsp. (2005) i Chmielewskiego i wsp. (2009). Otrzymane sekwencje zostały porównane z profilami allelicznymi dla wybranych sekwencji międzygenowych (ST18, ST20, ST37, ST51, ST57, ST61) dostępnych w bazie ifr 48 (http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/MST_Coxiella/mst) za pomocą programu BLAST (NCBI). Analizy filogenetyczne zostały wykonane przy wykorzystaniu programu MEGA5 oraz oprogramowania BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.gov/Blast.cgi>). W wyniku przeprowadzonych analiz genetycznych izolatów *C. burnetii* metodą MST otrzymano dwa profile genetyczne (MST3 i MST6), których obecność po raz pierwszy stwierdzono na terenie Polski, a które wcześniej opisywane były w Europie i na świecie. Badania wykazały, iż skutecznym narzędziem w monitorowaniu obecności *C. burnetii* w środowisku jest zestaw nukleotydów specyficznych dla wielokopijnej sekwencji międzygenowej (insercyjnej – *IS1111*⁺), a z punktu widzenia epidemiologicznego istotnym jest zaadoptowanie techniki MST wobec izolatów *C. burnetii* (P.4).

Moim kolejnym celem badawczym było określenie stopnia zainfekowania kleszczy *C. burnetii* zebranych ze zwierząt domowych i dzikich z wybranych regionów Polski

(woj. mazowieckie, łódzkie, lubelskie, podkarpackie oraz zachodniopomorskie) (P.11). Kleszcze mogą stanowić bowiem bardzo istotne ogniwo w transmisji zarazka w trakcie pobierania krwi od żywiciela, który może również zostać zainfekowany poprzez kontakt skórny czy wziewny z odchodami stawonogów (Anusz 1995; Marrie 1990; Mediannikov 2010). W Polsce nieliczne badania w tym kierunku obejmują analizę molekularną stawonogów na obecność drobnoustroju (Tylewska i wsp. 1996; Szymańska i wsp. 2012). W badaniach własnych wykryto charakterystyczne dla *C. burnetii* sekwencje IS1111⁺ u 3,1% kleszczy zebranych od zwierząt domowych, w 0,4% w przypadku drobnych gryzoni leśnych, a w 1,7% w przypadku dzikich zwierząt wolno żyjących (dzik, jelen, sarna), co jest zbieżne z wynikami innych autorów (Tylewska i Chmielewski 1996; Mediannikov i wsp. 2010; Sprong i wsp. 2012). Dodatkowo, po raz pierwszy w Polsce poddano analizie molekularnej na obecność specyficznej dla *C. burnetii* sekwencji IS1111⁺ materiał kliniczny (próbki tkanek organów wewnętrznych dzikich zwierząt wolno żyjących). W materiale genetycznym dla 3% badanych wykryto obecność poszukiwanych sekwencji. Dość szeroki wachlarz odsetka wyników pozytywnych wśród zwierząt dziko żyjących otrzymali również Smetanova i wsp. (2006) i Astobiza i wsp. (2011). Wyniki pracy zostały umieszczone w publikacji P.6.

O ile niski odsetek IS1111⁺ pozytywnych kleszczy zebranych od zwierząt domowych czy drobnych gryzoni leśnych może wskazywać na ograniczoną rolę badanych stawonogów w transmisji patogenu, to jednak nie należy bagatelizować ich funkcji w krążeniu drobnoustroju w środowisku. Występowanie kleszczy jako potencjalnych wektorów np. w środowisku leśnym jest ściśle uzależnione od siedliska, obecności określonych nisz ekologicznych czy pór roku, co w dużym stopniu decyduje o możliwości transferu patogenu, a tym samym o możliwości zakażenia człowieka. (Daszek i wsp. 2000).

Następnym czynnikiem biologicznym dla którego opracowane zostały zestawy narzędzi do szybkiej identyfikacji i różnicowania w obrębie podgatunków, jest pałeczka tularemii *F. tularensis*. W związku z dużym podobieństwem genetycznym w obrębie gatunku *F. tularensis* wyodrębniono 4 podgatunki: *F. tularensis* subsp. *tularensis* (typ A lub zwany dawniej *nearctica*), *F. tularensis* subsp. *holarctica* (typ B, zwany dawniej *palearctica*), *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* oraz *F. tularensis* subsp. *novicida*. W obrębie rodzaju *Francisella* zalicza się również gatunki niepatogenne dla ludzi: *F. philomiragia*, *F. noatunensis* oraz inne (zal. 4, II.A.23). W molekularnej identyfikacji *F. tularensis* wykorzystuje się głównie fragmenty wysoce konserwatywnych sekwencji genów: *fopA*, kodującego białko błony zewnętrznej (outer membrane protein gene) oraz *tul4*, kodującego lipoproteinę błony zewnętrznej (T-cell epitope membrane gene) (Fujita i wsp. 2006; Huntley

i wsp. 2007; Versage i wsp. 2003). Najczęściej w literaturze dotyczącej identyfikacji *F. tularensis* metodą real-time PCR stosowane są sondy molekularne o aktywności 5'-3' egzonukleazowej ukierunkowane na geny *tul4* i *fopA* (Higgins i wsp. 2000; Wicki i wsp. 2000; Versage i wsp. 2003; Emanuel i wsp. 2003), które w ramach badań własnych zostały zoptymalizowane w zakresie specyficzności i czułości wobec kolekcji izolatów *F. tularensis* jako propozycja do szybkiej identyfikacji patogenu w sytuacji zagrożenia życia zarówno w opracowywaniu ogniska epidemiologicznego, jak też w zdarzeniach bioterrorystycznych (P.10).

Nieliczne prace w literaturze światowej poświęcone są identyfikacji patogenu przy użyciu sond hybrydujących (Tomaso i wsp. 2003; Fujita i wsp. 2006). W badaniach własnych zaproponowany został po raz pierwszy w Polsce zestaw sond hybrydujących wykorzystujących zjawisko FRET. Zjawisko to dodatkowo umożliwia wyznaczenie i analizę krzywej topnienia amplifikowanego produktu, podnosząc specyficzność reakcji. Przeprowadzone badania na szerokim panelu izolatów *F. tularensis* pochodzących z różnych źródeł z całego świata (stanowiące kolekcję ODiZZB WIHiE) wykazały pełną przydatność opracowanych oligonukleotydów przy zachowaniu wysokiej czułości wykrywalności (10 fg/μl przy zastosowaniu układu nukleotydów zaprojektowanych dla genu *tul4*, a 1 fg/μl dla genu *fopA*). Tak wysoka czułość metody na poziomie wykrywalności śladowych ilości materiału genetycznego (pojedynczych kopii genów) w badanych próbkach jest niezmiernie istotna szczególnie w dochodzeniach towarzyszących działaniom terrorystycznym z użyciem czynników broni biologicznej na rozległym terenie (P.9).

Kolejnym obszarem analiz molekularnych było dobranie, w drodze analizy pełnych genomów czterech podgatunków *F. tularensis* dostępnych w bazie danych GenBank, odpowiednich sekwencji nukleotydowych do reakcji real-time PCR w celu różnicowania patogenu w obrębie podgatunku. Różnicowanie podgatunków było już przedmiotem badań Kugeler i wsp. 2006 i Gunnell i wsp. 2012 przy użyciu w jednej reakcji markerów specyficznych dla dyskryminowania typu A na podtypy AI i AII (charakterystycznych dla obszaru Ameryki Północnej) oraz typu B (typowego dla Europy i Azji) i *F. novicida* (charakterystycznego dla Ameryki Północnej i Tajlandii).

W badaniach własnych po raz pierwszy w Polsce przy użyciu w jednej reakcji dwóch zestawów sekwencji starterowych i sond hydrolizujących dokonano różnicowania wszystkich czterech podgatunków pałeczki tularemii. Różnicowanie podgatunkowe (typ A, typ B oraz *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* i *F. tularensis* subsp. *novicida*) w dwóch reakcjach duplex zorientowanych na geny *ISFtu2*, *rpoH1* i *pot*. Metoda ta jest wygodnym narzędziem

diagnostycznym, umożliwiającym relatywnie szybkie zdefiniowanie stopnia zjadliwości wykrytego patogenu i źródła pochodzenia w dochodzeniach epidemiologicznych lub w przypadku zdarzeń bioterrorystycznych.

Badania nad dyskryminacją gatunkową i podgatunkową *F. tularensis* zainspirowały mnie do głębszej analizy molekularnej na poziomie genotypowania zdeponowanych w ODiZZB 49 szczepów muzealnych *F. tularensis* o charakterze klinicznym, jak i środowiskowym, pochodzących z kolekcji Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdyni. Szczepy pozyskane zostały z terenów Polski (dzięki nieocenionej pracy Pana Profesora Eugeniusza Skrodzkiego i jego Zespołu), jak i z innych części świata. Zastosowana metoda Multispacer Typing (MST) umożliwiająca charakterystykę sekwencji w przestrzeniach międzygenowych wykazała się wysokim stopniem dyskryminacji badanych izolatów *F. tularensis* i umożliwiła wykrycie 23 nowych wariantów (genotypów ST), głównie w sekwencji międzygenowej S1. Dzięki tej metodzie szczepy polskiego pochodzenia zdefiniowane zostały głównie jako genotyp ST6. Wyniki badań molekularnych wskazują na utrzymywanie się czynnika w różnych rezerwuarach zwierzęcych na terenie Polski, wskazując możliwość powstania epidemii w warunkach naturalnych lub w efekcie np. narażenia zawodowego grupy leśników, myśliwych czy lekarzy weterynarii. Należy podkreślić, że były to pierwsze badania nad szczegółową charakterystyką molekularną *F. tularensis* pochodzących głównie z terenów Polski (15 szczepów), jak i 10 innych państw. Po raz pierwszy analizę molekularną szczepów *F. tularensis* z zastosowaniem metody Multispacer Typing przeprowadzili La Scola i wsp. (2008) oraz Li i wsp. (2011), jednak dotyczyły one izolatów pochodzących ze Szwecji i Francji. Stąd też unikatowość badań czyni je oryginalnym i znaczącym osiągnięciem na skalę międzynarodową. Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w pracy **P.7**.

Za szczególne osiągnięcia zawarte w cyklu publikacji wykazanych do przewodu habilitacyjnego uważam:

1. Opracowanie zestawów oligonukleotydów w celu podniesienia specyficzności reakcji real-time PCR dla poszczególnych docelowych sekwencji genów wybranych, wysoce niebezpiecznych czynników III grupy zagrożenia (kategoria A według CDC). Zastosowanie zaproponowanych zestawów oligonukleotydów (startery i sondy molekularne) w układzie sekwencyjnych lub multipleksowych reakcji real-time PCR umożliwi skuteczną weryfikację gatunkową, podgatunkową oraz toksynogenność

badanych izolatów, a także ograniczy czas oczekiwania na wynik. Opracowane narzędzia molekularne wpisują się w proces szybkiej diagnostyki w badaniach przesiewowych w rutynowej diagnostyce klinicznej, jak i w aspekcie zagrożenia bezpieczeństwa kraju w przypadku użycia czynników broni biologicznej, umożliwiając ich identyfikację na poziomie niezaprzeczalnym (najwyższym) – Allied Engineering Publication (AEP-66), the NATO Handbook for Sampling and Identification of Biological Chemical and Radiological Agents (SIBCRA).

2. Udoskonalenie metody odzyskiwania, namnażania i wykrywania przetrwalników *B. anthracis* w różnych próbkach środowiskowych (próbki gleby, woda, powietrze, materiał kliniczny).
3. Ocenę zmienności genetycznej pałeczki gorączki Q pochodzącej z próbek środowiskowych oraz klinicznych (wymaz z pochwy krów rodnych) przy aplikacji metody Multispacer Typing (MST). Z sukcesem ożywiono *C. burnetii* na linii komórkowej, a w efekcie scharakteryzowano typy sekwencyjne, utrwalając je na mapie innych genotypów.
4. Innowacyjne zastosowanie metody MST do genotypowania szczepów *F. tularensis* – pozyskanych od zwierząt, kleszczy oraz z próbek klinicznych od ludzi – pozwoliło na opisanie 23 nowych genotypów. Jest to znaczący postęp w pracach z zakresu filogenetyki tego czynnika oraz są to pierwsze tego rodzaju badania wykonane w Polsce. Nowo opisane sekwencje zdeponowane zostały w ogólnie dostępnej bazie danych European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), dzięki czemu badacze w skali międzynarodowej mają możliwość analiz i porównań swoich wyników w przypadku stwierdzenia nowych wariantów typów sekwencyjnych.
5. Uzupełnienie wiedzy dotyczącej *F. tularensis* i *C. burnetii* w aspekcie badania ich rezerwuarów zwierzęcych (dziki i sarny) oraz wektorów (kleszcze), które pozwoliły na określenie występowania tych czynników w przyrodzie. Perspektywa tych prac w odniesieniu do ochrony zdrowia ludzi i zwierząt jest obiecująca i zachęca do dalszych, ekspansywnych analiz środowiska i przyrody pod kątem zagrożeń dla ludzi.
6. Prezentowane badania wnoszą istotny wkład w doskonalenie metod identyfikacji szczególnie niebezpiecznych czynników biologicznych, stwarzając nowe możliwości ochrony zdrowia człowieka przed celowym atakiem bioterrorystycznym i naturalnymi źródłami zakażeń mikrobiologicznych.

Bibliografia

1. Antwerpen MH, Zimmermann P, Bewley K, Frangoulidis D, Meyer H. Real-time PCR system targeting a chromosomal marker specific for *Bacillus anthracis*. *Mol Cell Probes*. 2008;22(5-6):313-315.
2. Anusz Z. Q fever in humans and animals. Olsztyn, 1995.
3. Astobiza I, Barra M, Ruiz-Fons F, Barandika JF, Gerrikagoitia X, Hurtado A, García-Pérez AL. Molecular investigation of the occurrence of *Coxiella burnetii* in wildlife and ticks in an endemic area. *Vet Microbiol*. 2011;147(1):190-194.
4. Bartoszcze M. Metody wykrywania zagrożeń bronią biologiczną. *Przegl Epidemiol*. 2003;57(2):369-376.
5. Bartoszcze M, Bielawska A. The past, present and future of luminometric methods in biological detection. Rapid methods of Analysis of Biological Materials in the Environment. Ed. P. Stopa and M. Bartoszcze. Kluwer Academic Publisher Dordrecht/Boston/London, 2000:73-76.
6. Bode E, Hurtle W, Norwood D. Real time PCR assay for a unique chromosomal sequence of *Bacillus anthracis*. *J Clin Microbiol*. 2004;42(12):5825-5831.
7. Chakraborty B, Zaman K, Rahman MM. Rapid method for species-specific identification and determination of toxigenicity of *Vibrio cholerae* from natural aquatic environment. *S J Pharm Sci* 2008;1(1&2):69-75.
8. Chmielewski M, Sidi-Boumedine K, Duquesne V, Podsiadły E, Thiery R, Tylewska-Wierzbianańska S. Molecular epidemiology of Q fever in Poland. *Pol J Microbiol*. 2009;58(Supl 1):9-13.
9. Chomvarin C, Namwat W, Wongwajana S, Alam M, Thaew-Nonngiew K, Sinchaturus A, Engchanil C. Application of duplex-PCR in rapid and reliable detection of toxigenic *Vibrio cholerae* in water samples in Thailand. *J Gen Appl Microbiol*. 2007;53:229-237.
10. Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. Emerging infectious diseases of wildlife - Threats to biodiversity and human health. *Science*. 2000;287:443-449.
11. Ellerbrok H, Nattermann H, Özel M, Beutin L, Appel B, Pauli G. Rapid and sensitive identification of pathogenic and apathogenic *Bacillus anthracis* by real time PCR. *FEMS Microbiol Letters*. 2002;214(1):51-59.
12. Emanuel PA, Bell R, Dang JL, McClanahan R, David JC, and Burgess RJ. Detection of *Francisella tularensis* within infected mouse tissues by using a hand-held PCR thermocycler. *J Clin Microbiol*. 2003;41:689-693.
13. Fujita O, Tatsumi M, Tanabayashi K, Yamada A. Development of a Real-time PCR assay for detection and quantification of *Francisella tularensis*. *Jpn J Infect Dis* 2006;59:46-51.
14. Fykse EM, Skogan G, Davies W, Olsen JS, Blatny JM. Detection of *Vibrio cholerae* by Real-Time Nucleic Acid Sequence-Based Amplification. *Appl Env Microbiol*. 2007;73(5):1457-1466.
15. Glazunova O, Roux V, Freylikman O, Sekeyova Z, Fourous G, Tyczka J, Tokarevich N, Kovacova E, Marrie TJ, Raoult D. *Coxiella burnetii* genotyping. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(Suppl 8):1211-1217.
16. Gunnell MK, Lovelace CD, Satterfield BA, Moore EA, O'Neill KL, Robison RA. A multiplex real-time PCR assay for the detection and differentiation of *Francisella tularensis* subspecies. *J Med Microbiol*. 2012;61:1525-1531.
17. Helgason E, Okstad OA, Caugant DA, Johansen HA, Fouet A, Mock M, et al. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*-one species on the basis of genetic evidence. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66:2627-2630.
18. Higgins JA, Hubalek Z, Halouzka J, Elkins KL, Sjøstedt A, Shipley A, Sofi Inrahim M. Detection of *Francisella tularensis* in infected mammals and vectors using a probe-based polymerase chain reaction. *Am J Med Hyg*. 2000;62:310-318.
19. Hoffmaster AR, Ravel J, Rasko DA, Chapman GD, Chute MD, Marston CK, De BK, Jiang L, Cer RZ, Rilstone J, Peterson SN, Weyant RS, Galloway DR, Read TD, Popovic T, Fraser CM. Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *PNAS*. 2004;101(22):8449-8454.

20. Huang J, Zhu Y, Wen H, Zhang J, Huang S, Niu J, Li Q. Quadruplex Real-Time PCR assay for detection and identification of *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains and determination of their toxigenic potential. *Appl Env Microbiol.* 2009;75(22):6981-6985.
21. Huntley JF, Conley PG, Hagman KE, Norgard MV. Characterization of *Francisella tularensis* outer membrane proteins. *J Bacteriol.* 2007;189:561-574.
22. Jiang S, Chu W, Fu W. Prevalence of Cholera Toxin Genes (*ctxA* and *zot*) among Non-O1/O139 *Vibrio cholerae* Strains from Newport Bay, California. *Appl Env Microbiol.* 2003;69(12):7541-7544.
23. Khuntia HK, Pal BB, Meher PK, Chhotray GP. Quadruplex PCR for simultaneous detection of serotype, biotype, toxigenic potential and central regulating factor of *Vibrio cholerae*. *J Clin Microbiol.* 2008;46(7):2399-2401.
24. Klee SR, Tyczka J, Ellerbrok H, Franz T, Linke S, Baljer G, Appel B. Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. *BMC Microbiol.* 2006;6:2. doi.org/10.1186/1471-2180-6-2.
25. Kugeler KJ, Pappert R, Zhou Y, Petersen JM. Development of multi target real-time PCR for *Francisella tularensis* Types A and B. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(11):1799-1801.
26. La Scola B, Elkarkouri K, Li W, Wahab T, Fournous G, Rolain JM, Biswas S, Drancourt M. Rapid comparative genomic analysis for clinical microbiology: the *Francisella tularensis* paradigm. *Genome Res.* 2008;18:742-750.
27. Li W, Raoult D, Rolain JM, and La Scola B. Evidence of circulation of an epidemic strain of *Francisella tularensis* in France by multispacer typing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011;30:1135-1138.
28. Mainil JG, Daube G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? *J Appl Microbiol.* 2005;98:1332-1344.
29. Marrie TJ. Q fever - the disease. Ed. TJ Marrie, Boca Raton: CRC Press. 1990:244. doi.org/10.1016/0035-9203(91)90267-3.
30. Mediannikov O, Fenollar F, Socolovschi C, Diatta G, Bassene H, Molez JF, Sokhna C, Trape JF, Raoult D. *Coxiella burnetii* in humans and ticks in rural Senegal. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(4):654.
31. Nandi B, Nandy RK, Mukhopadhyay S, Nair GB, Shimada T, Ghose AC. Rapid method for species specific identification of *Vibrio cholerae* using primers targeted to the gene of outer membrane protein *OmpW*. *J Clin Microbiol.* 2000;38:4145-4151.
32. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11:142-201.
33. Niemczuk K, Szymańska-Czerwińska M, Zarzecka A, Konarska H. Q fever in a cattle herd and humans in the south-eastern Poland. Laboratory diagnosis of the disease using serological and molecular methods. *Bull Vet Inst Pulawy.* 2011;55:593-598.
34. Pannucci J, Okinaka RT, Sabin R, Kuske CR. *Bacillus anthracis* pXO1 plasmid sequence conservation among closely related bacterial species. *J Bacteriol.* 2002;184(1):134-141.
35. Pepper IL, Gentry TJ. Incidence of *Bacillus anthracis* in soil. *Soil Science.* 2002;167(10):627-635.
36. Ramisse V, Patra G, Vaissaire J, Mock M. The *Ba813* chromosomal DNA sequence effectively traces the whole *Bacillus anthracis* community. *J Appl Microbiol.* 1999;87:224-228.
37. Singh DV, Isac SR, Colwell RR. Development of a Hexaplex PCR Assay for Rapid Detection of Virulence and Regulatory Genes in *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *J Clin Microbiol.* 2002;40 (11):4321-4324.
38. Smetanova K, Schwarzova K, Kocianova E. Detection of *Anaplasma phagocytophilum*, *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* spp., and *Borrelia burgdorferii* in Ticks, and Wild-Living Animals in Western and Middle Slovakia. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1078(1):312-315.
39. Sprong H, Tjisse-Klasen E, Langelaar M, De Bruin A, Fonville M, Gassner F, Takken W, Van Wieren S, Nijhof A, Jongejan F, Maassen CB, Scholte EJ, Hovius K, Spitalska E, Van Duynhoven YT. Prevalence of *Coxiella burnetii* in ticks after a large outbreak of Q fever. *Zoonoses and Public Health.* 2012;59(1):69-75.

40. Szymańska-Czerwińska M, Galińska EM, Niemczuk K, Zasepa M. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in foresters and ticks in the south-eastern Poland and comparison of diagnostic methods. *Ann Agric Environ Med*. 2012;20(4):699-704.
41. Tomaso H, Scholz HC, Neubauer HA. Real-time PCR hybridization for the rapid and specific identification of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*. *Mol Cell Probes*. 2003;21:12-67.
42. Tozzi AE, Caprioli A, Minelli F, Ginaviti A, De Petris L, Edefonti A, Montini G, Ferretti A, De Palo T, Gaido M, Rizzoni G. Hemolytic uremic syndrome study group. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections associated with hemolytic uremic syndrome. Italy 1988-2000. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:106-108.
43. Tylewska-Wierzbanowska S, Kruszevska D, Chmielewski T, Żukowski K, Żabicka J. Ticks as a reservoir of *Borrelia burgdorferi* and *Coxiella burnetii* on Polish terrain. *Przegl Epidemiol*. 1996;50(Suppl 3):245-251.
44. Van Ness GB. Ecology of anthrax. Anthrax undergoes a propagation phase in soil before it infects livestock. *Science*. 1971;172:1303-1306.
45. Versage JL, Severin DDM, Chu MC, Peterson J M. Development of a multitarget real-time TaqMan PCR assay for enhanced detection of *Francisella tularensis* in complex specimens. *J Clin Microbiol*. 2003;41:5492-5499.
46. Wicki R, Sauter C, Mettler A, Natsch A. Swiss Army Survey in Switzerland to determine the prevalence of *Francisella tularensis*, Members of the *Ehrlichia phagocytophila* genogroup, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and tick-borne Encephalitis virus in ticks. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000;19:427-432.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych (nie wchodzących w skład osiągnięć naukowych, o których mowa w art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

Poza omówionym powyżej głównym cyklem prac w latach 2009-2011 prowadziłam również badania, w zakresie realizacji założeń projektu MNiSW, dotyczące występowania zakażeń hantawirusowych w rezerwuarze zwierzęcym w aspekcie przypadków zachorowań u ludzi w województwie podkarpackim. Od 2004 roku Polska była jednym z nielicznych państw, gdzie nie stwierdzono zakażeń hantawirusowych. W maju 2004 r. rozpoznano retrospektywnie zakażenie u jednej z pacjentek na Podkarpaciu. Prawdopodobne jest, że w pierwszej dekadzie obecnego stulecia przypadków zachorowań na gorączkę krwotoczną z zespołem nerkowym HFRS mogło być nawet 26. Byli to pacjenci Oddziału Nefrologii Wojewódzkiego Szpitala w Przemyślu z objawami niewydolności nerek i grypopodobnymi, u których nie wykonano jednak badań serologicznych. W wyniku wzmożenia nadzoru sanitarnego wraz z diagnostyką serologiczną odnotowano po raz pierwszy w Polsce w latach 2007-2008 epidemię zakażeń hantawirusowych w województwie podkarpackim. Powyższe dane epidemiologiczne skłoniły zespół ODiZZB wraz moim udziałem, pod nadzorem dr. hab. Janusza Kocika, do poszukiwania czynnika etiologicznego zakażeń hantawirusowych w rezerwuarze zwierzęcym na terenie objętym epidemią bowiem środowisko naturalne w tym regionie może być miejscem endemicznego występowania hantawirusów: *Puumala*, *Tula* czy

Dobrava-Belgrade. Założenia projektu dotyczyły oceny serologicznej pacjentów z objawami wskazującymi na zakażenia HFRS (wykryto 26% pozytywnych próbek), a także obejmowały odłów drobnych gryzoni leśnych: myszy polnej – *Apodemus agrarius*, myszy leśnej – *Apodemus flavicollis*, nornicy rudej – *Myodes glareolus*, nornika zwyczajnego – *Microtus arvalis*, myszy domowej – *Mus musculus* jako potencjalnych gospodarzy hantawirusów. Wzrost zachorowań koreluje z wielkością populacji drobnych zwierząt leśnych ściśle związaną z poprzedzającą masową produkcją pokarmu - owoców i nasion w drzewostanie dębu i buka (lata „nasienne”). Cykl ten może powtarzać się co 2-4 lata. W badaniach molekularnych z wykorzystaniem techniki real-time PCR zidentyfikowano po raz pierwszy w Polsce obecność wirusów *Puumala* i *Dobrava-Belgrade* w środowisku zwierzęcym, wykazując korelację z występowaniem zakażeń hantawirusowych u ludzi (zał. 4, II.A.14, II.D.38).

Kolejnym nurtem badań z moim współudziałem w obszarze wirusologii była analiza epidemiologiczna grypy w sezonie 2011-2012 wśród żołnierzy Sił Zbrojnych RP, ich rodzin i pracowników cywilnych wojska na Mazowszu i Lubelszczyźnie oraz oddziału polskiego misji pokojowej w Kosowie w Camp Bondsteel (KFOR) w ramach realizacji projektu „Surveillance and Testing for pathogens etiological for respiratory infectious diseases including Influenza strains with pandemic potential: Domestic and Deployed Sentinel Network in Polish Armed Forces with epidemiological/laboratory capacity at the Military Institute of Hygiene and Epidemiology, Warsaw & Pulawy, Poland” – projekt Global Emerging Infections Surveillance and Response System (2011) Nr SSPE-CT-2005-022639. GEIS umożliwił nadzór nad grypą i ostrymi infekcjami górnych dróg oddechowych grypopodobnych. W badaniach wykorzystano techniki biologii molekularnej (real-time PCR, multiplex real-time PCR) i mikrobiologii klasycznej (hodowle, testy biochemiczne i in.), za pomocą których zidentyfikowano wirusy głównie z rodzajów Coronavirus, Rhinovirus i Parainfluenza 1/2/3/4. Do najczęściej izolowanych patogenów bakteryjnych należał *Staphylococcus aureus*, który współwystępował z wymienionymi wirusami w odsetku 11,5%. Zaobserwowano stosunkowo niski odsetek adenowirusów, jak i wirusa grypy A/H3 i B, co w przypadku tych ostatnich mogło świadczyć o nabyciu przez społeczeństwo naturalnej oporności ze względu na epidemię wirusem grypy A/H1N1 notowanej dwa sezony wcześniej (sezon grypowy 2009-2010) (zał. 4, II.A.16). W cyklu badań nad zakażeniem wirusem grypy w ramach misji humanitarnej z inicjatywy WHO przeprowadzono dochodzenie epidemiologiczne w zachodniej Ukrainie w sezonie grypowym 2009-2010. Badania

przeprowadzono pod kierownictwem dr. hab. Janusza Kocika. Objęły one grupę ludności cywilnej w regionie Lwowa ze szczególnie ostrą niewydolnością oddechową. Materiałem do badań z użyciem technik multipleks real-time PCR w kierunku czynników etiologicznych grypy i zakażeń grypopodobnych były popłuczyny z jamy gardłowo-nosowej. Sekwencje nukleotydowe specyficzne dla wirusa grypy typu A wykryto w ok. 50% próbek, a szczepem dominującym okazał się szczep typu A/H1N1. Wyniki badań zostały umieszczone w publikacji (zał. 4, II.D.43).

Jednym z szerzej opracowanych, innych obszarów mojej aktywności badawczej była nowatorska analiza ekspozycji środowiskowej (zanieczyszczenia mikrobiologiczne) personelu służb ratownictwa medycznego w wybranych szpitalach klinicznych Warszawy. Badania przeprowadzono w ramach wieloletniego programu „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy” koordynowanego przez Centralny Instytut Ochrony Pracy (CIOP). Materiał do badań stanowiły różne stanowiska pracy służb ratownictwa medycznego, jak również miejsca potencjalnie wolne od zagrożeń biologicznych – pomieszczenia biurowe, z których próbki pobierano metodą wymazową, odciskową i przy użyciu poborników powietrza: metodą pochłaniania bioaerozolu w cieczy (aparatem stacjonarnym Coriolis) oraz metodą filtracji żelatynowej bioaerozolu (aparatem indywidualnym Button Sampler).

Wyniki oznaczeń mikrobiologicznych w szpitalnych oddziałach ratunkowych (SOR) i karetkach wykazały podwyższone ryzyko ekspozycji na szkodliwe czynniki. Dowodzą tego wyizolowane mikroorganizmy z grupy czynników potencjalnie chorobotwórczych z obecnością różnych fenotypów oporności na antybiotyki i alert patogenów. Poziom zanieczyszczenia bakteryjnego powietrza w środowisku szpitalnym wskazywał wyższe wartości w stosunku do karettek oraz miejsc kontrolnych. Rozkład grup mikroorganizmów w środowisku szpitalnym przy użyciu pobornika stacjonarnego wykazał obecność potencjalnie patogennych gronkowców koagulazo-ujemnych prezentujących mechanizmy oporności na antybiotyki oraz pałeczek niefermentujących, wśród których wyizolowano *Acinetobacter baumannii cplx*. Rozkład grzybów pleśniowych obejmował gatunki z rodzaju *Penicillium*, *Trichoderma* i *Aspergillus*. *Acinetobacter baumannii cplx* oraz *Aspergillus* należą do czynników alarmowych wg. listy z załącznika 1 Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dn. 22 kwietnia 2005 roku (Dz.U. 2005 nr 81 poz. 716). Wykazano wysoki odsetek patogenów alarmowych w próbkach pochodzących z korytarzy SOR (17,6%), a szczególnie z sal chorych – 25%. W przypadku karettek w próbkach powietrza wyizolowano 8,4% alert patogenów obejmujących koagulazo-ujemne gronkowce o fenotypie oporności MRCNS (Methicillin-Resistant Coagulase-Negative *Staphylococcus*) i MLS_B (Macrolides,

Linkosamide, Streptogramine gr. B). W przypadku miejsc kontrolnych dla próbek powietrza nie wyizolowano żadnych patogenów alarmowych. Analiza jakościowa bioaerozoli bakteryjnych przy użyciu pobornika indywidualnego wykazała, że dominującymi okazały się gronkowce koagulazo-ujemne, bakterie z rodzaju *Micrococcus*, *Kocuria* oraz *Bacillus* spp. W próbkach wymazowych i odciskowych pobranych w środowisku szpitalnym również dominowały pałeczki niefermentujące – 10,3% (*Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*) i koagulazo-ujemne szczepy bakterii z rodzaju *Staphylococcus*. Z kolei w środowisku karetek grupą dominującą okazały się z koagulazo-ujemne gronkowce z mechanizmami oporności na antybiotyki (MS_B – Macrolides, Streptogramine gr. B), MLS_B konst. oraz MRCNS. Różnica poziomu zanieczyszczeń Szpitalnych Oddziałów Ratunkowych oraz karetek wobec pomieszczeń biurowych wykazała różnice istotnie statystyczne. Wyniki prac zostały umieszczone w cyklu trzech publikacji (zal. 4, II.A.21,22,24). Odrębną częścią projektu było również badanie korelacji między zaburzeniami układu odpornościowego pracowników SOR i pracowników biurowych a poziomem zanieczyszczenia mikrobiologicznego miejsc pracy. W badaniach wykazano pozytywną korelację fagocytozy u pracowników biurowych, a zanieczyszczeniami grzybiczymi badanych powierzchni przy jednoczesnej negatywnej korelacji u ratowników medycznych, co można wyjaśniać prawidłową kompetencją układu immunologicznego u pracowników biurowych i domniemanymi zaburzeniami immunologicznymi u ratowników medycznych. W kolejnym etapie badań wykazano wpływ zanieczyszczenia grzybiczego ścian i podłóg na poziom limfocytów NKT (CD3+16+56+), wykazując dodatnią korelację (zal. 4, II.A.18,20).

W ramach projektu naukowo-badawczego NCBiR – „Mobilne laboratorium do poboru próbek środowiskowych i identyfikacji zagrożeń biologicznych” (2011-2014), Nr O ROB-0031-01/ID31/1 brałam czynny udział w walidacji systemu mikrofluidycznego przeznaczonego do szybkiego wykrywania i identyfikacji czynników biologicznych BMR, obejmujących panel bakteryjny przeznaczonego do użytku w laboratorium polowym. W procesie optymalizacji warunków reakcji real – time PCR w systemie mikrofluidycznym dokonano wyboru sekwencji docelowych wybranych czynników bakteryjnych: *Bacillus anthracis*, *Burkholderia mallei/pseudomallei*, *Brucella melitensis*, *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis* *Yersinia pestis*. W drodze analizy molekularnej wybranych fragmentów genów czynników biologicznych, przy wykorzystaniu genetycznych dostępnych baz danych (NCBI, EMBL, KEGG itd.), programów internetowych BLAST oraz FASTA33, Primer 3 Plus, LightCycler Probe Design, Primer BLAST i „In-silico PCR” zaprojektowano właściwe

startery i sondy molekularne. W badaniach zaproponowano wspólną temperaturę hybrydyzacji 60°C dla wszystkich par starterów i sond molekularnych, ustalając wspólny odczyt fluorescencji w kanale detekcji dla światła o długości fali 670 nm. Wyniki prac zostały przedstawione przez zespół Profesora Rafała Walczaka (Politechnika Wrocławska) na międzynarodowej konferencji w San Antonio, USA (zał. 4, III B.31).

W ramach doskonalenia metod detekcji przetrwalników *Bacillus anthracis* brałam również czynny udział w prestiżowych ćwiczeniach laboratoryjnych Joint Field Trials 5 Laboratory Test w Dugway Proving Ground w stanie Utah, USA. Doświadczenie zdobyte podczas ćwiczeń zostało również wykorzystane do opracowywania materiału nieznanego pochodzenia związanego z „incydentami kopertowymi z białym proszkiem” na potrzeby MON w latach 2003-2015. Brałam również aktywny udział w tworzeniu laboratorium III stopnia hermetyczności w Ośrodku Diagnostyki i Zwalczania Zagrożeń Biologicznych BSL3 (Biosafety Level 3) w Puławach. Od 1998 do 2009 r. brałam czynny udział jako wykonawca, koordynator i kierownik zespołu w międzynarodowych ćwiczeniach laboratoryjnych organizowanych przez NATO – SIBCRA (Sampling and Identification of Biological, Chemical and Radiological Agents) w zakresie zdolności do identyfikacji zakodowanych próbek o potencjale bioterrorystycznym. Jednym z cenniejszych osiągnięć wpisanych w działalność Zespołu Diagnostyki Molekularnej Pracowni Bakteriologii, kierowanego przeze mnie w zakresie detekcji i identyfikacji czynników biologicznych BMR, było otrzymanie 100% biegłości w diagnostycznej w 2009 r. Zdobyte doświadczenia i biegłość diagnostyczna utrzymywały w gotowości ODiZZB na wypadek użycia czynników broni biologicznej na terenie RP, w tym ataków węglkowych.

Od 2010 r. zarządzeniem dyrektora Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii objęłam stanowisko kierownika Pracowni Bakteriologii w Zakładzie Epizootologii i Zwalczania Zoonoz ODiZZB WIHiE. Jednym z ważnych nurtów mojej aktywności w tym czasie była działalność w zakresie opracowywania schematów szybkiej detekcji i identyfikacji czynników BMR na potrzeby służb mundurowych oraz ewaluacji zdolności wojskowych mobilnych jednostek rozpoznania biologicznego w ramach Obrony przed Bronią Masowego Rażenia (OPBMR). Na przełomie dwóch dekad mojej pracy w instytucji wojskowej jako pracownika cywilnego wojska i żołnierza zawodowego regularnie brałam udział w strategicznych dla Sił Zbrojnych WP przedsięwzięciach. Odbyłam szereg szkoleń i ćwiczeń na rzecz obronności państwa, w tym byłam zaangażowana w proces zabezpieczania i certyfikacji biologicznego komponentu Wielonarodowego Batalionu OPBMR 12. zestawu Sił Odpowiedzi NATO (SON) na poligonie w Drawsku w latach 2008

i 2015. Ćwiczenia obejmowały przygotowanie pozoracji użycia czynników BMR według przyjętego scenariusza z zachowaniem wytycznych standardów NATO (STANAG) celem nabycia umiejętności pobierania i wykrywania czynników biologicznych. W ramach przygotowań do EURO 2012 uczestniczyłam również w ćwiczeniach doskonalących przygotowanie Zespołów Rozpoznania Biologicznego Wojskowych Ośrodków Medycyny Prewencyjnej na wypadek sytuacji kryzysowych. Działalność tę zwieńczyły liczne doniesienia na konferencjach krajowych i międzynarodowych oraz dwa rozdziały w monografii: *CBRN Security Manager Book* (zał. 4, II.D.45,46).

Pozostałe moje prace opublikowane w czasopismach ze wskaźnikiem wpływu we współpracy z innymi autorami wpisują się w obszar badań nad: laseczką wąglika, mechanizmami zjadliwości, hamowania infekcji oraz nowoczesnymi metodami leczenia wąglika i *Brucella* spp. (zał. 4, II.A.13,17,25), przeglądu możliwych metod szybkiej detekcji i identyfikacji czynników biologicznych z grupy „biothreat” przy użyciu zaawansowanych narzędzi inżynierii genetycznej (zał. 4, II.A.15,19), a także oceny antybakteryjnej aktywności peptydów jako alternatywy dla antybiotykoterapii (zał. 4, II.D.40). Ważnym obszarem moich zainteresowań były również zagadnienia chorób zakaźnych w aspekcie rozwijającej się globalizacji, jak i zmian warunków klimatycznych (zał. 4, II.D.39, II.A.12), a także opracowanie rekomendacji dla służby zdrowia – propozycji postępowania w przypadku podejrzenia chorób zakaźnych lub nosicielstwa czynników chorób zakaźnych w kontekście medycznych badań diagnostycznych u uchodźców przybywających do Polski z terenów Syrii i Erytrei (zał. 4, II.D.44).

W ramach aktywności recenzenckiej wykonałam cztery recenzje dla czasopism naukowych o zasięgu międzynarodowym (*Journal of Hydrology*, *Chiang Mai Journal of Science*, *Thailand*, *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, *Letters in Applied Microbiology*).

Od 1997 r. jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów (PTM), a od 2003 r. należę do Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych (KIIDL) i posiadam prawo wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego (AA 04268).

Podczas swojej pracy naukowej otrzymałam dwa wyróżnienia finansowane przez komisję grantową Federacji Europejskich Towarzystw Mikrobiologów (FEMS), w ramach których odbyłam staże naukowe w Zakładzie Mikrobiologii Środowiskowej Uniwersytetu Hohenheim w Stuttgarcie, Niemcy, oraz wzięłam udział w międzynarodowym szkoleniu w Plymouth, Salisbury, Anglia, poświęconym zagadnieniom wąglika.

W efekcie współpracy polsko-amerykańskiej w zakresie obrony przed bronią biologiczną zostałam wyznaczona decyzją Dyrekcji WIHiE do odbycia rocznego stypendium naukowego w Instytucie Biologii Molekularnej i Medycyny Uniwersytetu w Scranton (Pensylwania, USA), finansowanego przez DARPA (Defense Advanced Research Project Agency). Zdobyte w Instytucie doświadczenie w zakresie nowoczesnych metod biologii molekularnej opartych na klonowaniu genów oporności antybiotykowej oraz amplifikacji sekwencji genów przy wykorzystaniu różnych technik PCR (AFLP-PCR, rep-PCR, ERIC-PCR, PFGE), a także bioinformatycznej analizy sekwencji nukleotydowych stały się inspiracją do dalszej pracy naukowej przy opracowywaniu metod szybkiej detekcji i identyfikacji szczególnie niebezpiecznych czynników biologicznych w Ośrodku Diagnostyki i Zwalczania Zagrożeń Biologicznych w Puławach.

W latach 2008-2012 zostałam wyznaczona przez prof. dr hab. Michała Bartoszcze – kierownika wieloletniego projektu badawczo-rozwojowego MON do koordynowania prac nad projektowaniem metod diagnostyki molekularnej dla wykrywania czynników biologicznych BMR. Pełniłam również rolę wykonawcy w dwóch projektach badawczo-rozwojowych MNiSW w ramach działalności statutowej, w jednym projekcie Narodowego Centrum Badania i Rozwoju (NCBiR) oraz w trzech projektach konsorcjum międzynarodowego, w tym Europejskiej Agencji Obrony (EDA) i Globalnej Sieci Nadzoru Wylaniających się Chorób Zakaźnych Departamentu Obrony USA (GEIS – Global Emerging Infections Surveillance). Brałam udział jako wykonawca w realizacji licznych projektów naukowo-badawczych finansowanych przez MON, MNiSW oraz ze środków europejskich.

W latach 2011-2013 pełniłam funkcję kierownika projektu badawczo-rozwojowego Narodowego Centrum Nauki finansowanego przez MNiSW pt. "Badanie środowiskowych rezerwuarów gorączki Q na obszarze endemicznego występowania *Coxiella burnetii*", który przyczynił się do powstania kilkunastu publikacji rozwijających zagadnienie poznania naturalnych rezerwuarów *C. burnetii* oraz szczegółowej charakterystyki molekularnej pozyskanych izolatów. Projekt zainspirował mnie również do podjęcia badań w kierunku analizy rezerwuarów i oceny molekularnej bogatej kolekcji szczepów *F. tularensis*.

W ramach promocji nauki uczestniczyłam w dwóch festiwalach nauki w Lublinie w latach 2008 i 2009, w prezentacjach opartych na praktycznym pokazie możliwości diagnostyki czynników niebezpiecznych przy użyciu szybkich metod detekcji. W ramach aktywności naukowej byłam członkiem komitetów organizacyjnych międzynarodowych konferencji naukowych, m.in. NATO Advance Research Workshop, International Conference – Protection against Bioterrorism.

W latach 2015-2016 pełniłam rolę promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim mgr. inż. Piotra Cieślika poświęconym charakterystyce molekularnej szczepów *F. tularensis*. Pełniłam również funkcję opiekuna naukowego studentów z kraju i zagranicznych, w tym w ramach programu Erasmus.

W zakresie dodatkowych aktywności pełniłam funkcję Sekretarza Rady Naukowej WIHiE (od 26 kwietnia 2018 r.). Byłam współautorką oceny eksperckiej wielu aktywności dla potrzeb MON, w tym współorganizowania pierwszego laboratorium BSL3 w Polsce, przygotowywania Zespołów Rozpoznania Biologicznego jako podstawowych komponentów zdolnych do szybkiego rozpoznania zagrożeń biologicznych na misji w Iraku i w Afganistanie. Brałam czynny udział w ocenie skuteczności działań Zespołów Rozpoznania Biologicznego i Laboratoriów Mobilnych podczas licznych międzynarodowych ćwiczeń wojskowych.

Osiągnięcia naukowo-badawcze nie uwzględniające osiągnięć zgodnych z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.) objęły 14 prac oryginalnych, w tym 8 z moim wiodącym udziałem, 13 prac poglądowych i autorstwo 8 rozdziałów w publikacjach zwartych. Sumaryczny ISI współczynnik wpływu dla prac publikowanych w ramach pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych wynosił 15,278 IF z łączną liczbą punktów MNiSW: 363. Wyniki pracy prezentowałam na 34 konferencjach i sympozjach naukowych, w tym 29 międzynarodowych i 5 krajowych, wśród których na 8 wygłoszone zostały referaty.

Sumaryczny IF według JCR (łącznie z rokiem opublikowania) wynosi 22,713. Łączna liczba punktów według listy MNiSW wynosi 509. Aktualny index Hirscha z bazy Web of Science z dn. 03.06.2019 r. wynosi 5. Liczba cytowań (bez autocytowań) – 56. Indeks Hirscha z bazy Scopus z dn. 03.06.2019 r. wynosi 5. Liczba cytowań (bez autocytowań) – 63. Potwierdzeniem punktacji prac naukowych jest załączona analiza bibliometryczna publikacji przygotowana przez pracownika sekcji bibliometrii Centrum Informacji w Bibliotece WUM dn. 03.06.2019 r.

Wykaz wszystkich moich publikacji, doniesień konferencyjnych oraz pozostałe działania składające się na moją aktywność naukową przedstawiłam w **załączniku 4**.

Zestawienie liczbowe osiągnięć naukowych:

Typ publikacji	Przed uzyskaniem stopnia dr n. biol.	Po uzyskaniu stopnia dr n. biol.	Suma prac	IF
W czasopismach znajdujących się w bazie JCR	-	13 oryginalnych 8 poglądowych	21	22,713
W czasopismach nieznajdujących się w bazie JCR	5 oryginalnych (w tym 2 w suplementach) 1 poglądowa	6 oryginalnych 5 poglądowych	17	-
Autorstwo rozdziału w monografii	2 rozdz. w j. angielskim	1 rozdz. w j. polskim 5 rozdz. w j. angielskim	8	-
Doniesienia konferencyjne międzynarodowe	14 (w tym 2 ustne)	15 (w tym 4 ustne)	29	-
Doniesienia konferencyjne krajowe	1	4 (w tym 2 ustne)	5	-
Ogółem	23	57	80	22,713

Ośmielam się sugerować, że moja wiedza z zakresu mikrobiologii środowiskowej, szczególnie w dziedzinie czynników biologicznych BMR oraz doświadczeń w planowaniu i prowadzeniu badań naukowych popartych przedstawionym dorobkiem publikacyjnym i osiągnięciami badawczymi upoważniają mnie do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego **nauk o zdrowiu**.

Agata Bielawska-Drózd