



AUTOREFERAT

Dr n. biol. Wioletta Adamus-Białek

Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach
Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu
Instytut Nauk Medycznych
Pracownia Genetyki

Kielce 2019

Spis treści

1. Imię i nazwisko	3
2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe.....	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	4
4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego w 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. z 2018 r. poz. 1789): .5	
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego:	5
4.2. Wykaz publikacji stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego.....	5
4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	7
4.3.1. WSTĘP i CEL NAUKOWY.....	7
4.3.2. OPIS OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO.....	9
4.3.3. PODSUMOWANIE I PRZYSZŁE CELE NAUKOWE.....	27
4.3.4. LITERATURA.....	30
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych.....	35
5.1. Realizowane tematy badawcze	35
5.2. Analiza bibliometryczna	47
5.3. Kierowanie międzynarodowymi i krajowymi projektami badawczymi oraz udział w takich projektach.....	49
6. Dorobek dydaktyczny i popularyzatorski oraz informacja o współpracy międzynarodowej habilitanta	51
6.1. Uczestnictwo w programach europejskich oraz innych programach	51
międzynarodowych i krajowych.....	51
6.2. Aktywny udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych.....	52
6.3. Udział w komitetach redakcyjnych i radach naukowych czasopism	55
6.4. Członkostwo w międzynarodowych i krajowych organizacjach oraz towarzystwach naukowych	55
6.5. Opieka naukowa nad studentami	55
6.6. Opieka naukowa nad doktorantami w charakterze opiekuna naukowego lub promotora pomocniczego	58
6.7. Staże w zagranicznych i krajowych ośrodkach naukowych lub akademickich.....	59
6.8. Recenzowanie publikacji w czasopismach międzynarodowych i krajowych	60
6.9. Współpraca naukowo-badawcza z innymi ośrodkami naukowymi.....	61

1. Imię i nazwisko

Wioletta Adamus-Bialek

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

- 2003** **Tytuł magistra biologii**, Instytut Biologii, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Akademia Świętokrzyska w Kielcach,
temat pracy magisterskiej: „Analiza mutantów transpozonowych *Proteus mirabilis* S1959 w reakcjach z surowicami anty-O3 i anty-R110”.
- 2003** Świadectwo ukończenia studiów podyplomowych „Przyroda w Zreformowanej Szkole”
Wydział Matematyczno – Przyrodniczy, Akademia Świętokrzyska w Kielcach
- 2008** **Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie mikrobiologia**, Wydział Biologii i
Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź
Temat rozprawy doktorskiej:
„Opracowanie nowej metody genetycznego różnicowania uropatogennych szczepów
Escherichia coli – TRS-PCR na podstawie genomowych trójnukleotydowych sekwencji
powtórzonych TRS”
promotor: dr hab. Paweł Parniewski
recenzenci: prof. dr hab. Antoni Różalski
 prof. dr hab. Jarosław Dziadek
- 2009** Świadectwo ukończenia studiów podyplomowych „Menedżer komercjalizacji i
transferu wiedzy”, Wydział Zarządzania i Administracji, Uniwersytet Humanistyczno-
Przyrodniczy Jana Kochanowskiego w Kielcach
- 2016** Świadectwo ukończenia studiów podyplomowych „Zarządzanie Organizacjami
Ochrony Zdrowia” Szkoła Główna Handlowa w Warszawie
tytuł pracy końcowej: „Wprowadzenie nowego produktu medycznego na rynek w
kontekście komercjalizacji badań naukowych”

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

01.10.2008 – 30.09.2009	Asystent , Samodzielny Zakład Ochrony i Kształtowania Środowiska, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach
01.10.2009 – 30.09.2016	Adiunkt , Katedra Ochrony i Kształtowania Środowiska, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach
01.10.2016 – 31.09.2017	Adiunkt , Zakład Mikrobiologii, Instytut Nauk Medycznych, Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach
01.10.2017 – obecnie	Adiunkt , Kierownik Pracowni Genetyki w Zakładzie Chirurgii i Pielęgniarstwa Chirurgicznego, kierownik zakładu: prof. dr hab. n. med. Stanisław Głuszek, Instytut Nauk Medycznych, Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego w 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. z 2018 r. poz. 1789):

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl powiązanych tematycznie publikacji oryginalnych, opublikowanych w recenzowanych czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) dotyczących molekularnej analizy epidemiologicznej uropatogennych szczepów *Escherichia coli* oraz analizy ich patogenności. **W publikacjach tych jestem pierwszym i korespondencyjnym autorem*.**

Łączna wartość bibliometryczna cyklu 6 publikacji składających się na osiągnięcie naukowe wynosi **Impact Factor – 13,202; MNiSW – 120.**

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego:

Molekularne badania epidemiologiczne uropatogennych szczepów *Escherichia coli* oraz analiza ich patogenności

4.2. Wykaz publikacji stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego

1. Adamus-Białek W*, Zajac E, Parniewski P, Kaca W, Comparison of antibiotic resistance patterns in collections of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* uropathogenic strains, *Mol Biol Rep*, 2013, 40(4):3429-35

IF: 1,958; MNiSzW 20

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu hipotezy badawczej i opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu badań, optymalizacji i wykonaniu doświadczeń (analiza lekooporności badanej kolekcji szczepów bakteryjnych), opisie procedur w rozdziale materiały i metody, analizie i interpretacji wyników badań, przygotowaniu części graficznej prezentowanych wyników badań (Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3), przygotowaniu manuskryptu do publikacji, poprawie całego artykułu w odpowiedzi na recenzje i korespondencji z redakcją. Ogółem mój udział określam na 70%.

2. Adamus-Białek W*, Lechowicz Ł., Kubiak-Szeligowska AB, Wawszczak M, Kamińska E, Chrapek M, A new look at the drug-resistance investigation of uropathogenic *E. coli* strains, *Mol Biol Rep*, 2017, 44(1):191-202

IF: 1,889, MNiSzW 15

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu hipotezy badawczej i opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu badań, optymalizacji i wykonaniu doświadczeń: analiza lekooporności badanej kolekcji szczepów bakteryjnych, opisie procedur w rozdziale materiały i metody, analizie i interpretacji

wyników badań, przygotowaniu manuskryptu do publikacji, poprawie całego artykułu w odpowiedzi na recenzje i korespondencji z redakcją. Ogółem mój udział określam na 75%.

3. Adamus-Białek W*, Baraniak A, Wawszczak M, Głuszek S, Gad B, Wróbel K, Bator P, Majchrzak M, Parniewski P, The genetic background of antibiotic resistance among clinical uropathogenic *Escherichia coli* strains, *Mol Biol Rep*, 2018, pp 1-11

IF: 1,889, MNiSzW 15

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu hipotezy badawczej i opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu części eksperymentalnej, współuczestnictwie w przeprowadzeniu doświadczeń (analiza lekooporności szczepów metodą dyfuzji krążkowej, identyfikacja szczepów ESBL metodą DDST oraz na płytkach chromID® ESBL plates (bioMérieux), analiza genetyczna lekooporności metodą PCR, analiza sekwencji nukleotydowych z wykorzystaniem BLAST (NCBI)), opisie procedur w rozdziale materiały i metody, analizie i opracowaniu części graficznej prezentowanych wyników badań, analizie i interpretacji uzyskanych wyników badań, przygotowaniu manuskryptu do publikacji, poprawie całego artykułu w odpowiedzi na recenzje i korespondencji z redakcją. Ogółem mój udział określam na 75%.

4. Adamus-Białek W*, Kubiak A, Czerwonka G, Analysis of uropathogenic *Escherichia coli* biofilm formation under different growth conditions, *Acta Biochim Pol*, 2015, 62(4): 765-71

IF: 1,187, MNiSzW 15

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu hipotezy badawczej i opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu badań, optymalizacji i współuczestnictwie w wykonaniu doświadczeń (metoda barwienia biofilmu fioletem krystalicznym, wykrywanie genów metodą PCR, hodowla szczepów bakteryjnych w różnych warunkach wzrostu), opisie procedur w rozdziale materiały i metody, wykonaniu analizy statystycznej i opracowaniu części graficznej prezentowanych wyników badań, analizie i interpretacji wyników badań, przygotowaniu manuskryptu do publikacji, poprawie całego artykułu w odpowiedzi na recenzje i korespondencji z redakcją. Ogółem mój udział określam na 80%.

5. Adamus-Białek W*, Vollmerhausen TL, Janik K, Hydrogen peroxide stimulates uropathogenic *Escherichia coli* strains to cellulose production, *Microb Pathog*, 2019, 126:287-291

IF: 2,332, MNiSzW 20

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu hipotezy badawczej, wykonaniu doświadczeń (barwienia biofilmu fioletem krystalicznym, analiza ekspresji genu kodującego celulozę metodą „calcofluor binding assay” oraz RT-PCR, hodowla szczepów bakteryjnych w różnych stężeniach wody utlenionej) opisie procedur w rozdziale materiały i metody, analizie i interpretacji wyników badań, wykonaniu analizy statystycznej i opracowaniu części graficznej prezentowanych wyników badań, przygotowaniu manuskryptu do publikacji, poprawy całego artykułu w odpowiedzi na recenzje i korespondencji z redakcją. Ogółem mój udział określam na 60%.

6. Adamus-Białek W*, Wawszczak M, Arabski M, Majchrzak M, Gulba M, Jarych D, Parniewski P, Głuszek S, Ciprofloxacin, amoxicillin, and aminoglycosides stimulate genetic and phenotypic changes in uropathogenic *Escherichia coli* strains, *Virulence*, 2019, 10(1): 260–276

IF 3,947, MNiSzW 35

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu hipotezy badawczej i opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu części eksperymentalnej, współuczestnictwie w przeprowadzeniu doświadczeń (opracowanie metody indukcji lekooporności i analiza mutantów), analizie statystycznej, opisie procedur w rozdziale materiały i metody, analizie i opracowaniu części graficznej prezentowanych wyników badań, analizie i interpretacji uzyskanych wyników badań, przygotowaniu manuskryptu do publikacji, poprawie całego artykułu w odpowiedzi na recenzje i korespondencji z redakcją. Ogółem mój udział określam na 65%.

4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

4.3.1. WSTĘP I CEL NAUKOWY

Moje zainteresowania genetyką i mechanizmami patogenności bakterii rozpoczęły się już w trakcie studiów magisterkich. Starłam się wyjaśnić wpływ mutagenizacji transpozonowej na wzrost rozpełzły i zmiany w strukturze lipopolisacharydu *Proteus mirabilis*. Na studiach doktoranckich rozpoczęłam badania nad szczepami *Escherichia coli* wyizolowanymi z moczu pacjentów ze zdiagnozowanym zakażeniem układu moczowego (ZUM). *Escherichia coli* jest dominującym (80%) czynnikiem etiologicznym zakażeń układu moczowego, wówczas zwyczajowo każdy taki szczep traktowano jako uropatogeny. Badania jednak dowodzą, że wyodrębnione klinicznie uropatogenne szczepy *Escherichia coli* (UPEC) to wyspecjalizowana na drodze ewolucji grupa bakterii (Dobrindt, 2005; Elena i wsp. 2005). Opisywano wówczas w literaturze także inne patotypy tego gatunku o specyficznych właściwościach predysponujących do różnych chorób. Oprócz typowych komensali jelitowych, zaobserwowano, że istnieje wiele swoistych serotypów *E. coli* wywołujących groźne dla zdrowia i życia biegunki (np. serotyp O157:H7 lub O104:H4). Wykazano również, że pewne szczepy *E. coli* mogą powodować zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych szczególnie u noworodków. Mimo, że gatunek ten był już od dawna głównym bakteryjnym modelem badawczym nadal nie opracowano jednoznacznych kryteriów różnicowania tego gatunku na poszczególne typy chorobotwórcze. Wynika to prawdopodobnie z niezwyklej „elastyczności” genomu bakterii *E. coli*, które pozwalają na jego modelowanie w zależności od warunków środowiska w jakich znajduje się populacja bakterii. Horyzontalny transfer genów, mechanizm CRISPR/cas, wyspy patogenności, plazmidy oporności, czy regulacja ekspresji genów to typowe przykłady czynników wpływających na ich zdolności przystosowawcze (Subashchandrabose i Mobley, 2015; Sokurenko, 2016; García-Martínez i wsp., 2018). Zaobserwowano, że poszczególne patotypy *E. coli* posiadają charakterystyczne dla swojej grupy łańcuchy

O-swoiste LPS oraz czynniki chorobotwórczości, jednak ich brak nie wyklucza zdolności do infekcji (Miyazaki i wsp., 2002; Kurazono i wsp., 2003). Zakażenie układu moczowego potencjalnie może być spowodowane przez każdy szczep *E. coli*, w zależności od sprzyjających warunków środowiska, predyspozycji gospodarza jak i możliwości adaptacyjnych bakterii.

Dostępne w literaturze analizy filogenetyczne dowodzą, że UPEC wykazują największe zróżnicowanie genetyczne względem innych szczepów *E. coli*. Badania dowodzą, że patotyp ten wyewoluował dużo wcześniej, niż patotypy jelitowe (Elena i wsp., 2005; Brzuszkiewicz i wsp., 2006). Analizy porównawcze genomów szczepów *E. coli* CFT073, *E. coli* O157:H7 i *E. coli* K-12 wykazały specyficzne regiony DNA dla szczepu UPEC. Odrębność filogenetyczna oraz obecność sekwencji unikatowych w uropatogennych szczepach *E. coli* świadczyć może zatem o niezależnej przynależności taksonomicznej tych patogenów (Dobrindt, 2005). Jednak rozróżnianie typowo uropatogennego szczepu *E. coli* od pozostałych szczepów nie było praktykowane przez klinicystów, choć bardzo istotne w dalszym procesie terapeutycznym. Wiele znanych technik genotypowania bakterii jak np. ERIC-PCR, REP-PCR, BOX-PCR nie różnicowało szczepów pod względem ich chorobotwórczości. Opracowanie nowej techniki genotypowania TRS-PCR uropatogennych szczepów *Escherichia coli* w przebiegu mojej pracy doktorskiej dało punkt wyjścia do dalszych badań nad chorobotwórczością UPEC. Zaobserwowano, że badana kolekcja szczepów bakterii *Escherichia coli* izolowanych z moczu wykazuje charakterystyczny podział na dwie odmienne grupy. Przy dokładniejszej analizie zaobserwowano korelację pomiędzy specyficznym wzorem profilu produktów reakcji PCR powstałych na bazie trójnukleotydu sekwencji powtórzonych CGG, a występowaniem genów wirulencji i opornością na antybiotyki z grupy chinolonów (Adamus-Białek i wsp., 2009). Szczepy odporne na fluorochinolony rzadko posiadały geny kodujące wybrane czynniki patogenności, a szczepy wrażliwe na fluorochinolony – odwrotnie, były bardziej wirulentne. Inni autorzy zaobserwowali, że podczas indukcji oporności na ciprofloksacynę szczepy *E. coli* utraciły pewne czynniki patogenności (Soto i wsp., 2006). Postulowano, że mechanizm ten związany jest z systemem naprawy DNA, odpowiedzią typu SOS, można zatem przypuszczać, że również z niestabilnością sekwencji TRS. Uzyskane wyniki badań w trakcie studiów doktoranckich były impulsem do dalszych badań nad uropatogennymi szczepami *E. coli*. Badania nad lekoopornością i patogennością były ważnym elementem prowadzonych przeze mnie molekularnych badań epidemiologicznych uropatogennych szczepów *E. coli*.

Biorąc pod uwagę powyższe, celem badań, które włączone zostały do osiągnięcia naukowego była molekularna analiza epidemiologiczna uropatogennych szczepów *E. coli* w aspekcie występowania cech wirulencji i nabywania lekooporności. Cel ten został zrealizowany poprzez:

- Szczegółową analizę lekooporności
- Różnicowanie szczepów *E. coli* w porównaniu do szczepów *P. mirabilis* na podstawie wrażliwości na wybrane antybiotyki

- Poszukiwanie zależności pomiędzy antybiotykami na podstawie poziomu wrażliwości badanych szczepów
- Wykorzystanie metod chemicznych i statystycznych w analizie lekowrażliwości i prognozowaniu narastania lekooporności
- Analizę uwarunkowań genetycznych lekooporności
- Badanie zależności pomiędzy występowaniem wybranych czynników patogenności, a zdolnością do tworzenia biofilmu
- Określenie zdolności bakterii *E. coli* do przeżycia i tworzenia biofilmu w niekorzystnych warunkach środowiska (mocz, wolne rodniki tlenowe, subinhibicyjne stężenie antybiotyków)
- Badanie wpływu wolnych rodników na produkcję celulozy u badanych szczepów
- Badanie wpływu antybiotyków na zmienność fenotypową i genetyczną badanych szczepów.

4.3.2. OPIS OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Głównym przedmiotem prowadzonych badań była kolekcja szczepów *Escherichia coli* wyizolowanych z moczu pacjentów z zakażeniem układu moczowego. *Escherichia coli* jest najważniejszym czynnikiem etiologicznym ZUM. Wynika to między innymi z bliskiego sąsiedztwa jelita grubego, w którym reprezentuje mikroflorę jelitową. Istotne znaczenie ma również obecność na powierzchni komórek *E. coli* fimbrii Typu 1, które pełnią najważniejszą rolę w adhezji (Terlizzi i wsp., 2017). Obecność *E. coli* w drogach moczowych może być incydentalna wynikająca np. z osłabienia organizmu i niewłaściwej odpowiedzi immunologicznej. Do ZUM mogą przyczyniać się również wady anatomiczne układu moczowego lub choroby sprzyjające tego typu zakażeniom jak np. cukrzyca (Williams i Schaeffer, 2004). *Escherichia coli* to szeroko rozpowszechniony gatunek w środowisku i życiu człowieka. W procesie ewolucji genom *Escherichia coli* ulegał zmianom, presja środowiska wymusiła liczne mutacje. Na drodze horyzontalnego transferu genów *E. coli* pozyskiwały od innych gatunków sekwencje nukleotydowe nadające im cechy patogenności. Dzięki tym zmianom wyspecjalizowały się w chorobotwórcze szczepy (Dobrindt i wsp., 2005; Elena i wsp., 2005). Dzisiaj ich występowanie w środowisku nie jest tylko wskaźnikiem zagrożenia występowania takich patogenów jak *Salmonella* spp., czy *Shigella* spp.. Występowanie w środowisku patogennych szczepów *Escherichia coli* stanowi równie poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego, jak np. wspomniane wyżej uropatogenne szczepy *Escherichia coli* (Terlizzi i wsp., 2017). Można wnioskować, że zdolność do przeżycia w niekorzystnych warunkach środowiska to priorytet tej grupy patogenów. Środowisko ubogie w substancje odżywcze, siły mechaniczne strumienia moczu, obecność antybiotyków i komórek układu immunologicznego stymulują do rozwoju wielu mechanizmów adaptacyjnych. Fenomenem ich przystosowania jest zdolność do tworzenia wewnątrzkomórkowych społeczności bakteryjnych IBC wewnątrz komórek baldaszkowatych pęcherza moczowego, co zapewnia im ochronę przed odpowiedzią immunologiczną gospodarza (Anderson i wsp., 2004; Hunstad i Justice, 2010). Zaobserwowano również

zdolność do utraty czynników patogenności w procesie nabywania lekooporności, co dodatkowo zmniejsza ich właściwości immunogenne (Zhanel i wsp., 1992; Soto i wsp., 2006; Wiles i wsp., 2008; Hunstad i Justice i wsp., 2010; Goneau i wsp., 2015). Problem rozprzestrzeniającej się i wzrastającej antybiotykooporności stanowi jeden z priorytetów WHO. Badania nad mechanizmami patogenności uropatogennych szczepów *Escherichia coli* wpisują się w pełni w ten problem. **Lekooporność wydaje się być kluczowym elementem patogenności UPEC i stanowiła podstawowe zagadnienie prowadzonych badań włączonych do osiągnięcia naukowego. Uzyskane wyniki badań mikrobiologicznych, molekularnych oraz chemicznych zostały poddane szczegółowym analizom przy zastosowaniu zaawansowanych narzędzi matematycznych. Pozwoliło to uzyskać wiele ważnych wniosków dotyczących patogenności *Escherichia coli* oraz wskazać na możliwości aplikacyjne narzędzi matematycznych w badaniach epidemiologicznych.**

Wyniki badań przedstawione w pierwszej publikacji wyszczególnionej w osiągnięciu naukowym (Adamus-Bialek W, Zajac E, Parniewski P, Kaca W, **Comparison of antibiotic resistance patterns in collections of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* uropathogenic strains, 2013, Mol Biol Rep, 40(4):3429-35**) pozwoliły na zaobserwowanie istotnych różnic i zależności w antybiotykooporności badanej kolekcji szczepów *Escherichia coli*, w porównaniu do kolekcji szczepów *Proteus mirabilis*. 129 szczepów *E. coli* oraz 3 różne kolekcje szczepów *P. mirabilis* poddano analizie lekowrażliwości na antybiotyki z grupy penicylin, cefalosporyn, karbapenemów, monobaktamów, aminoglikozydów, fluorochinolonów, polipeptydów oraz na tetracyklinę, nitrofurantoinę, kotrimoksazol i fosfomicynę. Gatunki te są blisko spokrewnione filogenetycznie, występują w tych samych środowiskach oraz mogą powodować podobne zakażenia, w tym układu moczowego. Antybiotyki stosowane w leczeniu tego typu zakażeń determinują ekspresję podobnych mechanizmów lekooporności. Mimo to, szczepy *E. coli* wykazały około 3 razy więcej zróżnicowanych profili lekooporności i 4 razy więcej unikalnych profili lekooporności w porównaniu do szczepów *P. mirabilis*. Dodatkowo, szczepy *P. mirabilis* wykazywały również bardziej jednorodną reakcję na działanie poszczególnych antybiotyków – większość szczepów (średnio 80%) wykazywała wrażliwość lub oporność na dany antybiotyk, podczas gdy szczepy *E. coli* wykazywały zróżnicowaną lekowrażliwość na antybiotyki. Zróżnicowanie szczepów *E. coli* na poziomie lekowrażliwości potwierdza ich heterogenną naturę w odróżnieniu od szczepów *P. mirabilis*. Można przypuszczać, że kierunki narastania lekooporności będą mniej przewidywalne, wynikające z wykorzystania przez szczepy *E. coli* różnych mechanizmów oporności na antybiotyki. Tego typu modelowanie lekooporności można uzyskać przy zastosowaniu analizy asocjacji pozwalającej na stworzenia tzw. map Kohonen'a, gdzie łatwo wskazać zależności pomiędzy różnymi antybiotykami. Można wywnioskować, że populacja szczepów *E. coli* może powodować bardziej zróżnicowane kierunki narastania lekooporności w porównaniu do *P. mirabilis*. To zróżnicowanie szczepów *Escherichia coli* może wynikać z tego, iż w badanej populacji szczepów wyizolowanych z moczu pacjentów ze zdiagnozowanym ZUM znajdują zarówno szczepy uropatogenne jak i nieuropatogenne. Należy również

podkreślić, że zastosowanie modelowania za pomocą map Kohonen'a wydaje się obiecującą techniką w przewidywaniu narastania bakteryjnej lekooporności i mogłaby być wykorzystana rutynowo do analiz epidemiologicznych lekooporności nie tylko w obrębie gatunku *E. coli* ale wielu innych chorobotwórczych szczepów, gdzie obserwuje się szybko narastająca lekooporność.

Uzyskane wyniki badań zainspirowały do poszukiwania dalszych zależności w obrębie mechanizmów lekooporności. W kolejnej publikacji wskazanej w osiągnięciu naukowym (**Adamus-Białek W, Lechowicz Ł., Kubiak-Szeligowska AB, Wawszczak M, Kamińska E, Chrapek M, A new look at the drug-resistance investigation of uropathogenic *E. coli* strains; 2017, Mol Biol Rep, 44(1):191-202**) tę samą kolekcję szczepów *Escherichia coli* analizowano pod względem wrażliwości na 37 antybiotyków ze wszystkich klas. Zastosowano nowatorską technikę atenuowanej spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera ATR FT-IR analizującą widma poszczególnych szczepów bakterii. Interpretację widm bakteryjnych w korelacji z wrażliwością na dany antybiotyk uzyskano za pomocą opracowania tzw. sztucznych sieci neuronowych. Dzięki temu, w czasie 24 godzin możliwe było wyselekcjonowanie szczepów wielolekoopornych MDR spośród badanej kolekcji *E. coli*. Obowiązujące standardy analizy lekooporności bakteryjnej wymagają wstępnej hodowli, izolacji szczepu, przygotowania antybiogramu i jego interpretacji co wymaga dużo większego nakładu pracy, czasu i kosztów. To nowatorskie zastosowanie kombinacji techniki ATR FT-IR z analizą statystyczną może być alternatywnym narzędziem w szybkim monitorowaniu szczepów wielolekoopornych. Wymaga jedynie przeprowadzenia prostej analizy spektrofotometrycznej całonocnej hodowli szczepów na podłożu stałym. Słabym punktem wydaje się skomplikowana interpretacja wyników analizy, co utrudnia zastosowanie jej w rutynowej diagnostyce. Może stanowić jednak dobry przyczynek do rozpoczęcia efektywnej współpracy jednostek naukowych ze stacjami epidemiologicznymi, czy diagnostycznymi. Zaawansowane techniki analizy statystycznej pozwoliły na wyróżnienie dodatkowych zależności między antybiotykami, a wrażliwością szczepów. Analiza stref zahamowanego wzrostu bakterii wokół krążka antybiotykowego metodą aglomeracji Warda okazała się skuteczną techniką różnicowania epidemiologicznego *E. coli*. Wyodrębniono 4 klastry szczepów wykazujących odmienne profile lekooporności, np. w klastrze 2 wszystkie szczepy były odporne na tigecyklinę, a wrażliwe na mecilinę, ampicilinę z sulbaktamem, meropenem, cefaleksin oraz cefadroksil. Dodatkowo klaster ten wykazywał znacznie częstsze występowanie czynników patogenności w porównaniu do klastra 1 i 3. Przedstawiony sposób analizy lekooporności może stanowić dodatkowe narzędzie w dochodzeniach epidemiologicznych szczepów bakteryjnych. Obecnie w różnicowaniu szczepowym stosuje się zaawansowane techniki genotypowania jak np. MLST, PFGE (Camelena i wsp., 2019). Jednak przykład prezentowanych badań własnych z zastosowaniem narzędzi matematycznych w różnicowaniu szczepów na podstawie profili lekooporności nie wymaga przeprowadzenia dodatkowych czasochłonnych i kosztownych technik laboratoryjnych, co może być kolejną alternatywą w różnicowaniu klonalnym szczepów. Kolejne analizy badań własnych przeprowadzono także na podstawie rozkładu średnic strefy zahamowanego wzrostu wszystkich

szczepów w odniesieniu do poszczególnych antybiotyków. Wartości strefy zahamowanego wzrostu badanej kolekcji *E. coli* porównano do takich samych wartości szczepów referencyjnych *E. coli* publikowanymi przez EUCAST. Szczepy referencyjne pochodzą z różnych kolekcji europejskich, a ich lekowrażliwość stanowi punkt odniesienia w standaryzowaniu granicznych wartości MBC i MIC antybiotyku oraz definiowaniu bakteryjnej oporności/wrażliwości na dany antybiotyk. To pozwala prowadzić ogólnoświatowy monitoring nad środkami przeciwdrobnoustrojowymi (van der Bij i wsp., 2012; Matuschek i wsp., 2014) oraz porównywać uzyskane wyniki badań do ogólnie przyjętych standardów publikowanych przez EUCAST lub CLSI. W prezentowanych wynikach badań własnych zaobserwowano, że szczepy różnie reagują na poszczególne antybiotyki. Zaproponowano tzw. grupy behawiorystyczne: „wrażliwa”, „nadchodząca średnio-wrażliwa”, „średnio-wrażliwa”, „oporna” i „zróżnicowana”. Badana kolekcja szczepów była klasyfikowana do grupy behawiorystycznej na podstawie największej liczby szczepów o jednorodnej reakcji na antybiotyk. Nie zidentyfikowano antybiotyku, który klasyfikowałby badaną grupę szczepów do analogicznej „nadchodzącej odpornej”. Grupy behawiorystyczne zostały zaproponowane w celu pokazania dystansu badanej kolekcji szczepów do granicy oporności na dany antybiotyk i zwrócenia uwagi na niebezpieczeństwo pojawienia się oporności na dany antybiotyk w populacji. Wskazówką w stosowaniu poszczególnych antybiotyków jest zatem klasyfikacja reprezentatywnej populacji bakterii w danej grupie behawiorystycznej. Tak na przykład, w przypadku badanej kolekcji szczepów *E. coli* izolowanych z moczu dalsze rutynowe stosowanie cefoksytiny, gentamycyny, netilmycyny, tikarcyliny z kwasem klawulanowym prawdopodobnie doprowadzi do pojawienia się oporności na te antybiotyki, ponieważ zaklasyfikowały one badaną kolekcję szczepów do grupy średnio-wrażliwej. Można również wnioskować, że przynależność do grupy „zróżnicowanej” będzie skutkowało nieprzewidywalną tendencją narastania oporności na antybiotyki z tej grupy, w tym przypadku będą to amoksycylina, ampicylina, piperacylina, ticarcyлина, chloramfenicol i fluorochinolony. Warto wziąć pod uwagę zaprzestanie stosowania antybiotyków z tych grup, aż do powrotu pełnej wrażliwości tej populacji bakterii. Porównanie badanej polskiej kolekcji szczepów do grupy europejskich szczepów referencyjnych (EUCAST) pozwoliło również zaobserwować dużo większą oporność na antybiotyki takie jak: amikacyna, ceftazydym, imipenem, cefoksytyna, netilmycyna, tobramycyna, tigecyklina, amoksycylina, chloramfenicol, moksifloksacyna i norfloksacyna. Różnice pomiędzy tymi grupami szczepów mogą wynikać z różnej polityki i lokalnych schematów stosowania antybiotyków w danym regionie. Podobne analizy porównawcze przedstawiane były przez innych autorów, np. Konca i wsp. (2016) przedstawili zróżnicowane profile lekooporności w zależności od regionu, czasu i innych cech, które mogą wskazywać na specyficzne trendy antybiotykooporności bakterii klinicznych. Przedstawione wyniki są przykładem jak kolejne narzędzie matematyczne może być wykorzystane w mikrobiologii klinicznej, w tym przypadku pomocne w racjonalnej antybiotykoterapii i przeciwdziałaniu rozprzestrzeniania lekooporności bakteryjnej. Narastająca lekooporność bakterii to poważny problem współczesnej medycyny, a jej źródło to nie tylko kraje azjatyckie ale również duża część Europy, gdzie stosowanie

antybiotyków jest rutynowe i empiryczne, często nieadekwatne do infekcji. Poważnym problemem jest także stosowanie antybiotyków o szerokim spektrum, w nieodpowiedniej dawce przy jednoczesnym zbyt długim leczeniu. Kontynuując analizy statystyczne wykorzystano współczynnik Kappa Cohena do wskazania konkretnych powiązań antybiotyków w zależności od ich działania na badane szczepy *E. coli*. Analiza Cohena pozwoliła wskazać jak cały zestaw szczepów reaguje na konkretny antybiotyk. Wykazano związki między antybiotykami: synergistyczne – mające taki sam wpływ na badaną kolekcję bakterii i antagonistyczne – wykazujące przeciwne działanie. Przedstawione zależności dotyczą tylko jednej grupy 127 szczepów bakterii, izolowanych z moczu na terenie województwa łódzkiego. Interesujące byłoby zastosowanie takiej analizy na większej populacji szczepów izolowanych z moczu pacjentów z różnych ośrodków w celu stworzenia reprezentatywnej bazy danych, która mogłaby być szybką i rzetelną wskazówką dla lekarzy w racjonalnej antybiotykoterapii. Na przykład analizując badaną kolekcję szczepów *E. coli* nie ma znaczenia, który antybiotyk z grupy synergistycznych zostanie zastosowany podczas leczenia, ponieważ wykaże on dokładnie takie samo działanie na bakterie. Z drugiej strony w przypadku pojawienia się oporności na dany antybiotyk, z powodzeniem można podjąć empiryczną decyzję o zastosowaniu antybiotyku z grupy antagonistycznych. Podobne analizy były przedstawione przez Obolskiego i wsp. (2016) używając innego matematycznego modelu. Zaobserwowali oni kilka różnych współwystępujących wzorców lekooporności i podobne zależności w stosunku do penicylin w obrębie szczepów *E. coli*. Stosowanie analiz matematycznych w mikrobiologii klinicznej nie jest typowe, natomiast prezentowane wyniki wskazują na olbrzymi potencjał tych narzędzi przydatnych w różnicowaniu, epidemiologii i antybiotykoterapii.

Zgłębiając wiedzę na temat lekooporności *E. coli*, kolejnym krokiem w moich badaniach była analiza mechanizmów oporności na antybiotyki. Stosowanie antybiotyków uruchamia różnorodne mechanizmy lekooporności u bakterii. Mogą to być indukcja produkcji białek rozkładających lub inaktywujących antybiotyki (betalaktamazy), modyfikacja białek PBP, aktywne usuwanie leku z komórki, horyzontalny transfer genów (plazmidy oporności na sulfonamidy), czy mutacje w genach (*gyrA*, *parC*) (Sanchez-Cespedes i wsp., 2015; Peterson i Kaur, 2018). W przebiegu prezentowanych badań własnych interesujące było, jak w przypadku badanych szczepów *Escherichia coli* – znane z literatury markery genetyczne będą korelowały z fenotypową opornością na antybiotyki. Przeprowadzono analizę genetyczną metodą PCR pod względem występowania genów *bla_{TEM}*, *bla_{CMY}*, *bla_{SHV}*, *bla_{OXA-1}*, *bla_{CTX-M-1}* korelujących z opornością na antybiotyki betalaktamowe. Dodatkowo analizowano obecność genu *aac(3)-II* korelującego z opornością na aminoglikozydy oraz genów *sul1*, *sul2* i *sul3* korelujących z opornością na sulfonamidy. Zbadano również występowanie mutacji w genach *gyrA* i *parC* oraz *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* w korelacji z lekoopornością na fluorochinolony. Wyniki badań przedstawiono w publikacji **Adamus-Białek W, Baraniak A, Wawszczak M, Głuszek S, Gad B, Wróbel K, Bator P, Majchrzak M, Parniewski P, The genetic background of antibiotic resistance among clinical uropathogenic *Escherichia coli* strains, 2018, Mol Biol Rep, pp 1-11.** Na występowanie badanych genów wpływa wiele

czynników, jak np. polityka antybiotykoterapii w danym kraju, źródło i rok izolacji poszczególnych szczepów bakterii, zdolności do transferu genów oraz mechanizmy nabywania lekooporności. Otrzymane wyniki badań własnych przedstawiają charakterystykę populacji bakterii sprzed 10 lat, co pozwoliło nam zauważyć zmiany obserwowane obecnie w podobnej populacji bakterii. Obecnie poważnym zagrożeniem epidemiologicznym są szczepy wytwarzające ESBL (ang. extended-spectrum beta-lactamases). Wśród badanej kolekcji bakterii zidentyfikowaliśmy ok. 1,5% szczepów wytwarzających β -laktamazy o rozszerzonym spektrum działania i 1,5% szczepów wytwarzających AmpC, co było w latach 2005 – 2007 standardowym poziomem. Sytuacja w Polsce wydaje się być względnie stabilna od 10 lat. Obecnie ok. 2% szczepów UPEC wytwarza ESBL, ale w wielu innych krajach sytuacja jest znacznie gorsza (Stefaniuk i wsp., 2016; Parajuli i wsp., 2017). Mechanizmy oporności na antybiotyki beta-laktamowe wydają się najbardziej skomplikowane i zróżnicowane. Jest to również wyraźnie widoczne w przypadku analizy genetycznej badań własnych. Gen *bla_{TEM}* był najczęściej wykrywanym genem w badanej grupie bakterii *E. coli* (91% szczepów; dane niepublikowane), a szczepy nieposiadające *bla_{TEM}* były wrażliwe na większość antybiotyków beta-laktamowych, głównie amoksycylinę. Biorąc pod uwagę, że zdecydowana większość izolatów była ESBL-ujemna pomimo obecności *bla_{TEM}*, można założyć, że zidentyfikowany gen koduje enzymy o szerokim spektrum, najprawdopodobniej TEM-1. TEM-1 to główny determinant oporności *E. coli* na amino-penicyliny i najpowszechniejsza β -laktamaza kodowana przez geny plazmidowe. Szacuje się, że ten enzym występuje w około 50% wszystkich izolatów klinicznych *E. coli* (Bailey i wsp., 2011; Ojdana i wsp., 2014). Kolejnym najczęściej występującym genem był *bla_{CMY-2}* (19,5% badanych szczepów), ale tylko jeden z nich był producentem beta-laktamazy AmpC, mimo, że występuje on na małych plazmidach kodujących enzymy AmpC (Bauernfeind i wsp., 1996). Pozostałe szczepy posiadające *bla_{CMY-2}* były w większości odporne na co najmniej jeden antybiotyk beta-laktamowy, ale nie zostały wykryte jako szczepy wytwarzające ESBL. Częstość występowania tego genu nie korelowała z opornością na antybiotyki betalaktamowe i wytwarzaniem ESBL. Podobnie było w przypadku analizy innych genów. Gen *bla_{OXA-1}* wykryty został tylko w jednym szczepie, który pomimo oporności na wszystkie analizowane antybiotyki beta-laktamowe (z wyjątkiem amoksycyliny z kwasem klawulanowym i imipenemu), nie został zaklasyfikowany jako ESBL-pozytywny. Również w przypadku genu *bla_{SHV}* – zidentyfikowano go tylko w jednym szczepie opornym tylko na jeden antybiotyk beta-laktamowy (ceftazydym), co może sugerować obecność betalaktamazy SHV-1 lub SHV-11 o szerokim spektrum działania (Shahi i wsp. 2013). Porównując prezentowane wyniki badań własnych do prac innych autorów - *bla_{CMY-2}* również często identyfikowano w szczepach *E. coli*, *Klebsiella* sp. i *Salmonella* spp. izolowanych z różnych źródeł w Stanach Zjednoczonych, Grecji i Algierii (Bauernfeind i wsp., 1996; Koeck i wsp., 1997; Fey i wsp., 2000, Winokur i wsp., 2000). W przypadku *bla_{OXA-1}* podobną częstość występowania obserwowali także inni autorzy (Alizade i wsp., 2015; Liao i wsp., 2017). Kolejny analizowany gen *bla_{CTX-M-1}* nie został wykryty w żadnym badanym szczepie *E. coli*, co jest zgodne z danymi publikowanymi przez innych autorów (Canton i Coque, 2006), mimo że pierwszy szczep wytwarzający β -laktamazę CTX-M-3 został zidentyfikowany w Polsce w 1996 r. i był dominującym

typem ESBL w kraju (Gniadkowski i wsp., 1998; Ojdana i wsp., 2014). Literatura pokazuje, że enzymy CTX-M identyfikowano w różnych miejscach w drugiej połowie XX wieku, między innymi w Argentynie, Izraelu i Paragwaju (Canton i Coque, 2006). W Europie za ekspresję tych beta-laktamaz odpowiadał gen *bla_{CTX-M-1}* po raz pierwszy zidentyfikowany w 1989 r. w Niemczech (Canton i Coque, 2006). Wyniki lekooporności z 2014 r. przedstawione przez Ojdana i wsp. (2014) wykazały, że gen *bla_{CTX-M-15}* został zidentyfikowany we wszystkich 12 analizowanych szczepach *E. coli* wyizolowanych od pacjentów w Białymstoku i tylko dwa szczepy były pozytywne dla genów *bla_{TEM-1}* i *bla_{SHV}*. Korzeniewska i wsp. (2013) opublikowali wyniki antybiotykooporności wśród szczepów *E. coli* izolowanych z różnych środowisk (ścieki szpitalne i komunalne, rzeka, powietrze). Zidentyfikowali około 30% szczepów ESBL-dodatnich, w tych szczepach geny *bla_{CTX-M-1}*, *bla_{CTX-M-3}*, *bla_{CTX-M-5}*, *bla_{CTX-M-15}* były najbardziej powszechne. W literaturze jest wiele publikacji prezentujących występowanie specyficznych genów w korelacji z fenotypową lekoopornością. Należy także zauważyć, że występowanie genów oporności na antybiotyki zazwyczaj różni się w szczepach różnego pochodzenia (Winokur i wsp., 2001). Biorąc pod uwagę oporność na inne antybiotyki, aminoglikozydy i sulfonamidy również odgrywają istotną rolę w leczeniu ZUM. Gen *aac(3)-II* jest opisywany jako najsilniej korelujący z opornością na aminoglikozydy, co jednak również nie zostało potwierdzone w naszych wynikach. Obie grupy badanych szczepów, odporne lub wrażliwe, posiadały lub nie *aac(3)-II*, dlatego należy stwierdzić, że w przypadku badanej kolekcji szczepów *E. coli* izolowanych z moczu ten gen nie może pełnić roli markera oporności na żaden antybiotyk aminoglikozydowy. Podobne wyniki opublikowane zostały przez innych autorów (Soleimani i wsp., 2014; Haldorsen i wsp., 2014). Przeanalizowaliśmy także występowanie genów *sul* w korelacji z opornością na sulfonamidy. Produkty tych genów zmieniają aktywność DHPS (syntazy dihydropteranianowej). Enzym ten wykazuje powinowactwo do PABA i kiedy jest kodowany przez *sul*, szczep pozostaje niewrażliwy na sulfonamidy. Trimetoprim, który stosowaliśmy w naszych badaniach, wiąże się z reduktazą dihydrofolianową i hamuje redukcję kwasu dihydrofoliowego (DHF) w kolejnym etapie tego samego szlaku metabolicznego (Caron i wsp., 2017). Interesujące było, czy istnieje korelacja między fenotypową opornością na trimetoprim i występowaniem genów *sul* – wyniki naszych badań nie potwierdziły takiej zależności. W literaturze udowodniono także związek genów *sul* z opornością na kotrimoksazol. W naszych badaniach wykazano powszechne występowanie genów *sul1* i *sul2* nawet w przypadku szczepów wrażliwych na trimetoprim lub kotrimoksazol. Wyniki przedstawione przez innych autorów pokazują podobny rozkład tych genów (Huovinen i wsp., 1995; Sköld, 2001). Ponadto, w przypadku wyników badań własnych rzadkie występowanie *sul3* w badanej kolekcji szczepów *E. coli* może wskazywać, że synteza zmodyfikowanego DHPS z powodu ekspresji genu *sul3* pojawiła się niedawno w opornych szczepach bakterii (Grape i wsp., 2003). Potwierdza to wysoką częstość występowania w tej grupie wątpliwych i negatywnych wyników uzyskanych metodą PCR. Sulfonamidy stosuje się w ZUM jako połączenie sulfametoksazolu z trimetoprimem. Była to dominująca terapia UTI w latach 1995 – 1996. Obecnie, ze względu na coraz częstsze występowanie oporności na trimetoprim-sulfametoksazol wśród szczepów *E. coli*, nie powinna to być pierwsza metoda z wyboru w leczeniu

zakażenia *E. coli* (Kallen i wsp., 2006). Na uwagę zasługuje również wysoka częstość występowania genów *sul* co może skutkować szybkim pojawieniem się oporności na tę substancję. Najbardziej oczywiste wyniki analizy genetycznej uzyskano podczas identyfikacji mutacji punktowych w genie *parC* (kodującym topoizomerazę IV) i *gyrA* (kodującą gryazę DNA). Wiadomo jest, że mutacja Ser/80/Ile w *parC*, a także mutacje Ser/83/Leu i Asp/87/Asn w *gyrA* silnie korelują z fenotypową opornością na chinolony (McDonald i wsp., 2001). Wyniki badań własnych potwierdzają te doniesienia. **Ponadto wykazaliśmy po raz pierwszy, że nagromadzenie mutacji w tych genach zmniejsza wrażliwość na fluorochinolony w przypadku badanych szczepów *E. coli*.** Co więcej, liczne ciche mutacje w tzw. „hot spot” loci (swoiste miejsce mutacji) były charakterystyczne dla *parC*, a mutacje zmiany sensu identyfikowano w innych kodonach *gyrA*. **Można wnioskować, że badanie sekwencji genów *gyrA* i *parC* u bakterii może odgrywać predykcijną rolę w zakresie oporności fenotypowej na fluorochinolony i czyni ją użyteczną w badaniach epidemiologicznych.** Znaczenie cichych mutacji w procesie adaptacji i zmian fenotypowych u różnych organizmów jest opisywane w literaturze (Supek, 2016). Inne ciche mutacje zostały również zidentyfikowane przez innych autorów (Thong i wsp., 2016; Yang i wsp., 2017). Analiza pojawiania się mutacji w populacji bakterii podczas procesu nabywania oporności na fluorochinolony wydaje się interesująca. Ta kumulacja mutacji może wynikać z niskiej specyficzności działania fluorochinolonów. Z drugiej strony, fluorochinolony mogą indukować odpowiedź SOS, która może indukować mutacje DNA w genomie bakterii, między innymi w regionach genów *gyrA* i *parC* (Baharoglu i wsp., 2011). Ciche mutacje mogą również wywoływać efekt fenotypowy poprzez regulację transkrypcji (Agashe i wsp., 2016; Hauber i wsp., 2016); ewentualnie mogą również zmieniać powinowactwo fluorochinolonów do miejsca wiązania. Ciekawą obserwacją uzyskaną w pracy badawczej jest to, że miejsce „hot spot” *parC* było bardziej swoiste ale mniej wrażliwe na fluorochinolony (wiele cichych mutacji w hot spot) w porównaniu do „hot spot” *gyrA* – wiele mutacji zmiany sensu w różnych loci. Nie zidentyfikowaliśmy innych specyficznych mutacji w badanych genach *gyrA* i *parC* korelujących z opornością fenotypową ale w literaturze znane są inne mutacje, na przykład w *gyrA* – Ser/83/stop, Asp/82/Asn, Gly/81/Asp, Asp/82/Gly, Ser/431/Pro (Cesaro i wsp., 2008). Dodatkowo, oporność na fluorochinolony może być również spowodowana obecnością plazmidów wytwarzających białko Qnr (QnrA, QnrB, QnrS), które chroni miejsce wiązania DNA przed chinolonem. Plazmidy Qnr indukują oporność na niskim poziomie, ale zaobserwowano również, że ich obecność silnie wzmacnia oporność na fluorochinolony (Tran i wsp., 2005) W związku z powyższym badana kolekcja szczepów *E. coli* została poddana analizie również na obecność genów *qnr*. Żaden ze szczepów nie posiadał jednak genów *qnr*. Rzadkie występowanie tych genów potwierdzono w innych publikacjach (Jlili i wsp., 2014; De Silva i wsp., 2017). Mammeri i wsp. (2005) zbadali 297 szczepów *E. coli* opornych na kwas nalidyksowy i zidentyfikowali tylko 1 szczep z genem *qnr*. Niektórzy autorzy przedstawiają odmienne wyniki, prawdopodobnie zależy to od lokalnej dystrybucji plazmidu Qnr. **Podsumowując, analiza genetyczna nie jest wystarczająca do identyfikacji bakteryjnej oporności na antybiotyki, jedynie z wyjątkiem oporności na fluorochinolony. Analizy genetyczne mogą odgrywać rolę w**

przewidywaniu oporności i mogą wskazywać na wysokie lub niskie ryzyko pojawienia się oporności. Wyniki pracy udowadniają po raz pierwszy, że nagromadzenie niespecyficznych mutacji w genach topoizomerazy i gyrazy zmniejsza wrażliwość na fluorochinolony. Rozkład analizowanych genów jest bardzo zróżnicowany i wykazuje wysoki potencjał adaptacyjny bakterii *E. coli* do toksycznego środowiska (antybiotyku).

Zaintereowanie mechanizmami patogenności badanych szczepów *E. coli* poprowadziło moje badania w kierunku zdolności bakterii do przeżycia i tworzenia biofilmu w różnych, niekorzystnych warunkach środowiska. Naturalne środowisko bakterii UPEC to mocz oraz komórki baldaszkowate pęcherza moczowego, do którego bakterie przytwierdzają się w pierwszych etapach adhezji (Hunstad i Justice, 2010). Określenie zdolności do przeżycia badanej kolekcji szczepów *E. coli* i rozwoju biofilmu w środowisku sztucznego moczu było kolejnym etapem badań własnych. Wyniki analiz zostały przedstawione w pracy **Adamus-Białek W, Kubiak A, Czerwonka G, Analysis of uropathogenic Escherichia coli biofilm formation under different growth conditions, 2015, Acta Biochim Pol, 62(4): 765-71**. Heterogenność badanych szczepów *Escherichia coli* ujawniła się również na poziomie tworzenia biofilmu. Hodowlę szczepów bakteryjnych prowadzono w środowisku sztucznego moczu i w warunkach optymalnych (podłoże wzrostowe bulion LB) przez 96 godzin w 37°C. Wzrost badano spektrofotometrycznie na podstawie gęstości optycznej (A_{600}). W przypadku hodowli w warunkach optymalnych zaobserwowano, że szczepy osiągnęły swój maksymalny i stabilny poziom zmętnienia po 24 godzinach, co oznacza, zatrzymanie fazy logarytmicznego wzrostu. Zdolność do tworzenia biofilmu badana była techniką barwienia fioletem krystalicznych komórek bakteryjnych przytwierdzonych do powierzchni płytki titracyjnej (poliuretanowej) również spektrofotometrycznie (A_{531}). Technika ta bada biofilm bakteryjny na pierwszym etapie adhezji komórek do powierzchni stałych. **W badaniach wykazano, że poziom biofilmu również osiągnął maksimum po 24 godzinach i statystycznie znacząco następowała jego redukcja w kolejnych godzinach eksperymentu, co mogło być związane z „cyklem życia” biofilmu, tendencją do rozprzestrzeniania się komórek bakteryjnych i zubożeniem podłoża w składniki odżywcze.** Ta obserwacja nie jest zgodna z przekonaniem, że bakterie zwykle potrzebują więcej czasu na utworzenie biofilmu. Należy podkreślić, że biofilm uropatogennych szczepów *E. coli* nie jest typowy w porównaniu z większością gatunków bakterii tworzących powszechnie opisywane struktury biofilmu jak np. *S. aureus* lub *P. aeruginosa* (Spiers i wsp., 2003; Zhang i wsp., 2015). Średni poziom biofilmu był dużo niższy w porównaniu do typowo opisywanych biofilmów ale szczepy UPEC nie muszą tworzyć rozległej i złożonej aglomeracji komórek na powierzchni. Charakterystyczne są dla nich tzw. wewnątrzkomórkowe wspólnoty bakteryjne IBC (ang. intracellular bacterial communities), które chronią je przed komórkami immunologicznymi gospodarza. W pierwszym etapie bakterie przytwierdzają się do odpowiednich receptorów komórek baldaszkowatych pęcherza moczowego i szybko przenikają do ich wnętrza, aby zdążyć przed napływem neutrofilów (Hannan i wsp., 2012). Obserwowane wyniki własne mogą odzwierciedlać to zachowanie bakterii. Istotną rolę pełnią tutaj

czynniki adhezyjne (Bergsten et al., 2005), co zostało potwierdzone również w naszych badaniach – **szczypty z obecnością genów kodujących fimbrie P i/lub S były zdolne do tworzenia istotnie statystycznie większego biofilmu, niż szczepy nie posiadające tych genów.** Podczas badań staraliśmy się znaleźć bezpośredni związek między obecnością innych genów (*sdiA*, *rscA* i *rpoS*), a zdolnością bakterii do tworzenia biofilmu (Ito i wsp., 2007; Ranjit i Young, 2013; Wei i wsp., 2001). Geny te są opisywane w literaturze jako kluczowe w tworzeniu biofilmu, jednak wykazano ich obecność we wszystkich badanych szczepach *E. coli*. Można więc wnioskować, że nie obecność genu ale jego poziom ekspresji uruchamia proces tworzenia biofilmu, co przede wszystkim uzależnione jest od czynników środowiska (Schembri et al., 2003). Analizując kolejne wyniki prezentowanych badań własnych, podczas hodowli bakterii w syntetycznym moczu zaobserwowano znaczący spadek wzrostu i tworzenia się biofilmu w porównaniu do warunków optymalnych. Niemniej jednak różnica gęstości optycznej dla wzrostu pomiędzy warunkami optymalnymi, a syntetycznym moczem była wyższa, niż różnica obserwowana pomiędzy tworzeniem się biofilmu. Na tej podstawie określony został poziom względnego biofilmu niezależnie od gęstości optycznej bakterii w hodowli. **Wykazano, że bakterie wytworzyły względnie większy poziom biofilmu w syntetycznym moczu, niż w warunkach optymalnych. Można wnioskować, że w środowisku abiotycznym komórki bakteryjne były bardziej zaangażowane w tworzenie biofilmu, niż w podziały.** Przeprowadzono także obserwację mikroskopową biofilmu uformowanego na szkle i wybarwionego barwnikami fluorescencyjnymi. Badane szczepy *E. coli* na podłożu szklanym tworzyły typowe struktury skupisk bakterii z charakterystycznymi, opisywanymi w literaturze nitkowatymi komórkami, które tworzą się na etapie uwalniania bakterii z komórek pęcherza w celu zasiedlenia następnych (Justice i wsp., 2004). Wydłużone komórki powstają ze względu na zahamowanie podziału ściany komórkowej, przy jednoczesnych podziałach nukleoidu co powoduje, że stają się one „niewidoczne” dla komórek układu immunologicznego gospodarza. **Można założyć, że tego typu zdolność bakterii *E. coli* określa ich przynależność do patotypu uropatogennego, należałoby jednak ocenić przede wszystkim ich zdolność do wnikania do wnętrza komórek eukariotycznych.** Porównując wyniki tworzonego biofilmu badanej kolekcji szczepów na płycie poliuretanowej i szkle – nie zaobserwowano żadnych korelacji, **szczypty tworzące silny biofilm na szkle nie odzwierciedlały podobnych właściwości na poliuretanie i odwrotnie.** Rozbieżność ta może być związana z różnymi etapami biofilmu obserwowanymi stosując różne techniki. Badanie biofilmu za pomocą fioletu krystalicznego pozwala głównie sprawdzić zdolności adhezyjne bakterii. W prezentowanych badaniach zwykle szczepy bakterii, które tworzyły mikrokolonie na powierzchni szkła charakteryzowały się różnym poziomem adhezji do poliuretanu. Mechanizm powstawania biofilmu można także powiązać z innymi właściwościami szczepów bakteryjnych. Zależność pomiędzy tworzeniem się biofilmu, a powierzchnią (poliuretan, szkło) może być związana z hydrofobowością powierzchni i błony zewnętrznej określonego szczepu (Krasowska i Sigler, 2014; Liu i wsp., 2004). Prawdopodobnie bakterie hydrofobowe przyczepią się lepiej do hydrofobowego poliuretanu i na odwrót. Nasze wstępne badania wykazały, że analizowane szczepy *E. coli* charakteryzowały się zróżnicowaną hydrofobowością powierzchni komórek, ale trudno

było to skorelować ze zdolnością tworzenia biofilmu (wyniki niepublikowane). **Podsumowując, przedstawione w osiągnięciu naukowym wyniki zawarte w tej publikacji dostarczają wielu cennych informacji na temat patogenności badanej kolekcji szczepów *E. coli*. Wnioski są również zgodne z obserwacjami uzyskanymi podczas analizy lekooporności – badana kolekcja szczepów *E. coli* wydaje się być wysoce heterogenną grupą bakterii. Jeden gatunek bakterii (*Escherichia coli*) wyizolowany z tego samego środowiska (mocz) może różnie przylegać do różnych powierzchni i wykazywać zróżnicowaną zdolność do wzrostu i tworzenia biofilmu.**

Kontynuując badania nad mechanizmami patogenności uropatogennych *E. coli*, intrygujące było nie tylko jak badana grupa bakterii „radzi sobie” z antybiotykami, czy abiotycznym moczem ale również z innymi czynnikami występującymi podczas stanu zapalnego. We wczesnych etapach infekcji szczepy UPEC stymulują receptor TLR4, który wyzwała napływ leukocytów PMN (Agace, 1996). Dodatkowo, podczas infekcji komórki nabłonkowe i immunologiczne wytwarzają panel cytokin, chemokin i cząsteczek zapalnych, takich jak tlenek azotu i reaktywne formy tlenu (Hunstad i Justice, 2010; Blomgran i wsp., 2004; Bian i wsp., 2000), których źródłem może być nadtlenek wodoru. Halliwell i wsp. (2000) wykryli stężenia H_2O_2 powyżej 0,1 mM w świeżo wydalonym ludzkim moczu zdrowych osób. Przewiduje się, że ze względu na mechanizmy obronne gospodarza stężenia antybakteryjnego nadtlenu wodoru są jeszcze wyższe w moczu pacjentów z ZUM (Long i wsp., 1999; Halliwell i wsp., 2000). Postawiliśmy hipotezę, że obecność reaktywnych form tlenu to kolejny czynnik, który może stymulować bakterie *E. coli* do uruchomienia mechanizmów obronnych. Celem badań była analiza odpowiedzi *E. coli* na obecność H_2O_2 jako źródło reaktywnych form tlenu, a wyniki uzyskanych analiz opublikowano w pracy **Adamus-Białek W, Vollmerhausen TL, Janik K, Hydrogen peroxide stimulates uropathogenic *Escherichia coli* strains to cellulose production, 2018, *Microb Pathog*, 126:287-291**. Zbadano kolekcję 25 klinicznych uropatogennych szczepów *Escherichia coli*, w tym szczep *E. coli* nr 71.8, jako szczep referencyjny. Podczas optymalizacji eksperymentu określono 0,625 mM H_2O_2 jako minimalne sub-inhibicyjne stężenie nadtlenu wodoru względem wzrostu szczepu referencyjnego. W takim stężeniu H_2O_2 w bulionie LB w 37°C przez 24 godziny prowadzono hodowlę wszystkich szczepów w odniesieniu do warunków kontrolnych. Mimo, że poziom wzrostu został znacząco zredukowany, a tolerancja nadtlenu wodoru różniła się pomiędzy szczepami, to większość szczepów *E. coli* (85%) była w stanie przetrwać całonocną ekspozycję na nadtlenek wodoru. Przeprowadzono również eksperyment krótkiej, 15 minutowej ekspozycji badanych szczepów na wyższe stężenia nadtlenu wodoru (0,625 – 275 mM) i okazało się, że niektóre szczepy przeżyły nawet najwyższe badane stężenie nadtlenu wodoru (275 mM), a ponad połowa szczepów była w stanie przetrwać w 137 mM H_2O_2 podczas tego doświadczenia. **Zaobserwowana niewrażliwość *E. coli* na wysokie stężenia nadtlenu wodoru była zgodna z wynikami badań Schembri i wsp. (2003)**. Poza tym wykazaliśmy, że *E. coli* jest znacznie bardziej tolerancyjna wobec badanego stężenia H_2O_2 , niż linia T24 ludzkich komórek nabłonkowych pęcherza moczowego, które nie były w stanie przetrwać całonocnej hodowli w podłożu z dodatkiem 0,625 mM

H₂O₂, podczas gdy niższe stężenie 0,125 mM H₂O₂ nie było cytotoksyczne (test XTT, dane nie publikowane). Można wnioskować, że według danych literaturowych stężenia H₂O₂ obecne w drogach moczowych nie są bakteriobójcze wobec UPEC ale należy wziąć pod uwagę, że to nie jedyny składnik zaangażowany w stan zapalny podczas infekcji. W dalszych badaniach przedstawionej publikacji te same kliniczne szczepy UPEC analizowano również pod względem tworzenia biofilmu po całonocnej hodowli w bulionie LB z 0,625 mM nadtlakiem wodoru. Poziom tworzenia biofilmu był znacząco zredukowany (ok 50% redukcja biofilmu) ale dużo mniej zróżnicowany w porównaniu do hodowli w warunkach optymalnych. Analizując analogicznie jak w poprzednich badaniach – względny przyrost biofilmu, niezależny od poziomu wzrostu bakterii w bulionie – **nie zaobserwowano hamującego wpływu H₂O₂ na tworzenie się biofilmu. Jest to zgodne z wynikami opisanymi wcześniej (Adamus-Białek i wsp., 2015), prawdopodobnie nadtlenek wodoru (tak jak abiotyczny mocznik) ograniczył podziały komórkowe, co skutkowało zmniejszoną liczbą przytwierdzonych komórek bakteryjnych do powierzchni poliuretanu.** Można wnioskować, że sub-inhibycyjne stężenie nadtlaku wodoru może spowalniać ale nie hamować tworzenia się biofilmu *E. coli*. **Zaobserwowaliśmy dodatkowo, że podczas hodowli z sub-inhibycyjnym stężeniem nadtlaku wodoru istotnie statystycznie wzrosło wytwarzanie celulozy w przypadku szczepów klinicznych oraz szczepu referencyjnego *E. coli* nr 71.8 i jego izogenicznego mutantu *csgBA::Cm* z zahamowaną ekspresją fimbrii „curli”, a z aktywną produkcją celulozy.** Literatura podaje, że istnieją wspólne etapy w szlakach biosyntezy celulozy i fimbrii „curli” – *csgD* jako regulator transkrypcji *curli* aktywuje również biosyntezę celulozy (Gerven i wsp., 2018). Zaobserwowaliśmy jednak redukcję ekspresji *csgBA* i *csgD* w szczepie dzikim *E. coli* pod wpływem badanego stężenia nadtlaku wodoru (dane niepublikowane), co wskazuje na inny, niezależny szlak biosyntezy celulozy indukowany przez nadtlenek wodoru, obserwacje te wymagają jednak dalszych badań. **Mimo, że literatura podaje pozytywny wpływ celulozy na tworzenie biofilmu, nasze wyniki tego nie potwierdziły – zwiększona produkcja celulozy nie korelowała ze wzrostem poziomu biofilmu.** Uzyskane wyniki badań własnych sugerują, że produkcja celulozy może chronić bakterie przed toksycznym wpływem wolnych rodników tlenowych i także innych składników procesu zapalnego, o czym wspominają inni autorzy (Zhou i wsp., 2001; Kai-Larsen i wsp., 2010). **Należy również wziąć pod uwagę, że wytwarzanie celulozy może modyfikować właściwości adhezyjne powierzchni bakterii (Krasowska i Sigler, 2014; Gonçalves i wsp., 2016). Jeżeli obecność wolnych rodników indukuje do wzmożonej produkcji celulozy, wówczas bakterie mogą stać się bardziej hydrofilowe i zwiększać powinowactwo do powierzchni hydrofilowych (Ma i Wood, 2009; Adamus-Białek i wsp. 2015).** Ostatnie badania wykazały, że stosowanie hydrofilowych materiałów w cewnikach może zapobiegać ZUM (Cardenas i Hoffman, 2009; Rognoni i Tarricone, 2017). Z drugiej strony powinowactwo szczepów wytwarzających celulozę do hydrofilowych powierzchni może zwiększać ryzyko zakażeń u pacjentów cewnikowanych. Z pewnością produkcja celulozy i tworzenie biofilmu zwiększają zdolność bakterii do infekcji dróg moczowych, często nawracających (Norinder i wsp., 2011). Należy również wziąć pod uwagę, że indukowana ekspresja celulozy przez wolne rodniki zmniejsza adhezję do błony śluzowej, co

prowadzi do łatwiejszej eliminacji z dróg moczowych. Ponadto, odpowiedź bakteryjna na ROI wiąże się z ekspresją wielu genów, w tym genów kodujących inne czynniki wirulencji. Kontakt uropatogennych *E. coli* z komórkami eukariotycznymi wyzwała kaskadę skomplikowanych zdarzeń (Blomgran i wsp., 2004). Ekspozycja *E. coli* na ROI aktywuje zróżnicowany zestaw genów antyoksydacyjnych, które są kontrolowane przez regulator SoxRS, endonukleazę IV i dehydrogenazę glukozo-6-fosforanową. H₂O₂ indukuje także aktywator transkrypcji OxyR, który kontroluje ekspresję genów dla katalazy/hydroperoksydazy (*katG*), reduktazy glutationowej (*gorA*) i podjednostki C reduktazy alkilowej (*ahpC*) w *E. coli* (Long i wsp., 1999). Zaobserwowaliśmy w trakcie badań, że faza wzrostu logarytmicznego była opóźniona w hodowli z sub-inhibicyjnym stężeniem nadtlenu wodoru w porównaniu do wzrostu w warunkach optymalnych, co może reprezentować okres adaptacji, w którym patogeny naprawiają wewnątrzkomórkowe uszkodzenia i uruchamiają ekspresję katalazy w celu zneutralizowania toksycznego H₂O₂. Uropatogenne *E. coli* są doskonale wyposażone w cały szereg mechanizmów, które zwiększają odporność na oksydacyjne i nitroaktywne cząsteczki efektorowe gospodarza (Fux i wsp., 2005). Podsumowując, wyniki prezentowanych badań własnych to kolejny dowód na nieprzerwany „wścig zbrojeń” między patogennymi bakteriami a ludźmi. **W naszym badaniu wykazaliśmy, że sub-inhibicyjne stężenia nadtlenu wodoru są cytotoksyczne w stosunku do komórek nabłonka moczowego i są w stanie spowolnić wzrost bakterii, a następnie tworzenie się biofilmu, ale nie niszczą wszystkich komórek bakteryjnych w populacji. Z drugiej strony stwierdzono, że wytwarzanie celulozy jest stymulowane przez nadtlenek wodoru, czynnik, który może utrudniać pozostanie bakterii w pęcherzu i zmniejszyć hydrofobowość powierzchni bakterii.** Jednak dalsze badania nad ekspresją poszczególnych genów zaangażowanych w ten szlak biochemiczny, a przede wszystkim *csgD* może dać ważną obserwację dla wyjaśnienia mechanizmu ekspresji tych czynników indukowanych działaniem nadtlenu wodoru. Interesujące jest także, jak inne urospecyficzne adhezyny i toksyny (np. *cnf1*, hemolizyna) będą ulegać ekspresji w środowisku wolnych rodników tlenowych, uwalnianych podczas wybuchu tlenowego neutrofilii wielojądrzastych. Silnym wsparciem i potwierdzeniem uzyskanych obserwacji byłoby przeprowadzenie analogicznych badań w hodowlach tkankowych (np. T24).

Wyniki wcześniejszych analiz były inspiracją do głębszych badań nad uropatogennością badanych szczepów *E. coli*. Badania obejmowały wykorzystanie uropatogennych szczepów *E. coli* wyposażonych w geny wirulencji i wrażliwych na wszystkie analizowane antybiotyki. Technikę indukcji lekooporności opracowano poprzez zastosowanie subinhibicyjnego stężenia (sub-MIC) różnych antybiotyków (amoksycyliny, ciprofloksacyny, gentamycyny i tobramycyny). Po okresie średnio 20 dni pasażowania pięciu różnych szczepów *E. coli* w sub-MIC poszczególnych antybiotyków wyselekcjonowano ponad 120 mutantów (pochodnych) z wyindukowaną opornością na dany antybiotyk. Mutanty *E. coli* porównano z ich szczepami dzikimi na podstawie profili wrażliwości, genów wirulencji, tworzenia biofilmu i wzorców produktów reakcji CGG-PCR opartej na zastosowaniu starterów

zawierających powtórzone sekwencje troj nukleotydowe CGG. Dalsze analizy mutantów ujawniły szereg interesujących obserwacji i wniosków, które opublikowano w pracy **Ciprofloxacin, amoxicillin, and aminoglycosides stimulate genetic and phenotypic changes in uropathogenic Escherichia coli strains**, Adamus-Białek W*, Wawszczak M, Arabski M, Majchrzak M, Gulba M, Jarych D, Parniewski P, Głuszek S, 2019, **Virulence**. Obecnie problem bakteryjnej antybiotykoterapii jest szeroko analizowany, nie tylko pod względem typowych mechanizmów oporności ale również rozważany w kontekście złożonej patogenności bakteryjnej (Schroeder i wsp., 2017). Mechanizmy adaptacji bakterii do środowiska należą do jednych z najstarszych ewolucyjnie, można więc założyć, że bakterie mogą regulować je różnymi szlakami metabolicznymi. W związku z tym postawiliśmy hipotezę, że antybiotyki mogą również wywoływać globalne zmiany w patogennych szczepach *Escherichia coli*. Przede wszystkim chcieliśmy zbadać konsekwencje długotrwałej ekspozycji szczepów UPEC na subletalne stężenia różnych antybiotyków. Podobne badania na innych gatunkach bakterii były już publikowane (Zhanel i wsp., 1992; Goneau i wsp., 2015; Schroeder i wsp., 2017; Ranieri i wsp., 2018), nie mniej jednak mechanizm działania antybiotyków na różne szlaki metaboliczne u bakterii wymaga dalszych badań. Ekspozycja bakterii na podprogowe stężenia antybiotyków jest ważnym czynnikiem pojawienia się oporności, zwłaszcza, że może się to zdarzyć podczas empirycznego stosowania antybiotyków lub profilaktycznego użycia ich w hodowli zwierząt.

Pierwsze obserwacje dotyczyły tempa generacji mutantów, zmian w profilach lekooporności i stabilności nabytej oporności wśród wyselekcjonowanych mutantów *E. coli*. Prawie wszystkie badane szczepy *E. coli* uzyskały lekooporność podczas inkubacji z sub-MIC wszystkich stosowanych antybiotyków. Tylko jeden szczep *E. coli* nie wygenerował oporności na ciprofloksacynę i okazał się najbardziej stabilnym szczepem bakteryjnym. Ciprofloksacyna indukowała oporność najszybciej, zaraz po pierwszym pasażu, a oporność na wszystkie fluorochinolony obserwowano we wszystkich mutantach. Podobne obserwacje opisali Soto i wsp. (2006). Oporność ta jest szybko generowana przez specyficzne mutacje w genach *gyrA* i *parC* (Cirz et al., 2005), które są nieodwracalne i silnie skorelowane z opornością na wszystkie fluorochinolony. Odpowiada to wcześniej przedstawionemu synergicznemu działaniu antybiotyków (korelacja kappa Cohena), gdzie oporność na jeden fluorochinolon była zgodna z opornością na wszystkie fluorochinolony (Adamus-Białek i wsp., 2017). Ponadto **zaobserwowana korelacja między jednoczesną indukowaną opornością na ciprofloksacynę oraz na pozostałe fluorochinolony, a także na amoksycylinę z kwasem klawulanowym i trimetoprim wskazuje na niebezpieczny mechanizm oporności krzyżowej wśród szczepów UPEC**. Ta oporność krzyżowa może być skorelowana z indukcją ekspresji pompy systemu efflux, która usuwa antybiotyk z komórki (Saito et al., 2006). Chang i wsp. (2007) sugerowali, że mutacje *gyrA* lub *parC* są silnie skorelowane z biosyntezą AcrAB i opornością na betalaktamy, w tym na kwas klawulanowy. Podobne korelacje zwiększonej biosyntezy AcrAB/TolC i zmniejszonej biosyntezy OmpC mutantu *S. typhimurium* opornego na ciprofloksacynę zostały przedstawione przez Fabrega i wsp. (2009). Rola ArcAB-TolC w indukcji oporności na wiele antybiotyków została opisana również przez innych autorów (Liu i wsp., 2004;

Marquet i wsp., 2018). **Zgadza się, że należy rozważyć wykluczenie fluorochinolonów z rutynowego leczenia w terapii ambulatoryjnej i poszukiwanie alternatyw w antybiotykoterapii.** Stosowanie fluorochinolonów staje się coraz bardziej wątpliwe, a wielu naukowców podkreśla ograniczenie ich stosowania (Trautner, 2018; Durkin i wsp., 2018). **Nie mniej jednak, nasze badania udowodniły, że ciprofloksacyna indukowała oporność krzyżową na najmniejszą liczbę antybiotyków w porównaniu z innymi antybiotykami. Amoksycylina również bardzo szybko indukowała oporność (tuż po drugim pasażu) i wygenerowała najwięcej mutantów.** Amoksycylina indukowała również oporność na inne betalaktamy tylko w około 25% mutantów, ale oporność na amoksycylinę z kwasem klawulanowym pojawiła się u 85% mutantów tej grupy. Biorąc pod uwagę stabilność indukowanej oporności, mutanty traciły oporność na amoksycylinę lub cefoksytynę podczas pasażowania hodowli w warunkach optymalnych, podczas gdy oporność na amoksycylinę z kwasem klawulanowym była nieodwracalna, co zaobserwowano również w przypadku oporności na ciprofloksacynę. Indukcja wzmożonej biosyntezy chromosomalnej betalaktamazy AmpC w przypadku *E. coli* nie jest możliwa z powodu braku genu *ampR*, który bierze udział w aktywacji transkrypcji *ampC*. Dlatego biosynteza AmpC w przypadku szczepów *E. coli* jest nieindukowalna, ale jest regulowana przez promotora i atenuatora (Jacoby, 2009). Obserwacje te mogą być prawdopodobnie wynikiem nadekspresji genów kodujących ArcAB, jak wspomniano powyżej. Innym potencjalnie indukowanym mechanizmem może być powrót do pierwotnej struktury błony z biosyntezą poryn OmpC. Wydaje się, że mocnym argumentem są również zakłócenia techniczne podczas analizowania średnic strefy zahamowanego wzrostu bakterii. Wartości te były zbliżone wokół krążka amoksycyliny i krążka amoksycyliny z kwasem klawulanowym, a wrażliwość na te antybiotyki była silnie obniżona w porównaniu ze szczepami typu dzikiego. Zatem różnice te mogą wynikać z technicznych interpretacji tabel EUCAST, w których normy klasyfikacji bakterii pod względem oporności w przypadku amoksycyliny i amoksycyliny z kwasem klawulanowym są różne. Analizując pozostałe betalaktamy – wszystkie mutanty pozostały wrażliwe na imipenem. **Nasze poprzednie i obecne badania dowiodły, że imipenem wydaje się być najskuteczniejszym antybiotykiem przeciwko szczepom UPEC.** Podobne obserwacje przedstawili inni autorzy (Yayan i wsp., 2015). Zasadniczo antybiotyki betalaktamowe traktowane są jako leki bezpieczniejsze niż inne, a obecnie stanowią złoty standard w terapii antybiotykowej. Jednak obserwuje się wzrastającą oporność bakterii na karbapenemy, wytwarzających nowe warianty betalaktamaz NDM (Grover i wsp., 2017; Rahman i wsp., 2018). W naszym badaniu oprócz szybko rozwijającej się tolerancji na antybiotyki, amoksycylina indukowała oporność krzyżową na największą liczbę antybiotyków. Rutynowe i empiryczne stosowanie betalaktamów nie jest dobrym rozwiązaniem, biorąc pod uwagę te odkrycia i stale pojawiające się nowe beta-laktamazy o coraz szerszym spektrum aktywności. Podczas prowadzonych badań własnych najmniej „wpływowo” antybiotyki okazały się **aminoglikozydy, które najrzadziej wywoływały oporność krzyżową w wyselekcjonowanych mutantach *E. coli*.** Obserwacje te wynikają z innych mechanizmów oporności na leki, które są związane z translacją i strukturą rybosomów (Serpensu i wsp., 2008). Ponadto **zaobserwowaliśmy również statystycznie istotną**

zwiększoną wrażliwość na ciprofloksacynę w korelacji z opornością na gentamycynę. Może to wynikać z ich antagonistycznych mechanizmów oporności na leki. Suzuki i wsp. (2014) udowodnili, że oporność na aminoglikozydy zmniejsza siłę napędową protonu, która zmniejsza biosyntezę AcrB, prowadząc do podatności na leki, których bakterie nie mogą wykluczyć z komórki. Co ciekawe, zaobserwowaliśmy również przeciwne zjawisko, w którym **indukcja oporności na ciprofloksacynę powodowała zwiększoną wrażliwość na gentamycynę i netilmycynę. Ta odwrotna zależność może być związana ze zwiększoną ekspresją systemu wypływu *acrAB* – TolC.** Atac i wsp. (2018) udowodnili, że wśród szczepów *E. coli* ST131 nadekspresja *marA* była skorelowana z opornością na chinolony. Co więcej, oporność na gentamycynę była statystycznie niższa w ST131 niż w non-ST131. W naszych badaniach amoksycylina również wykazała podobną zależność, ale tylko w przypadku netilmicyny. Ogólnie przyjmuje się, że fluorochinolony, betalaktamy i aminoglikozydy mogą działać synergistycznie, więc ta intrygująca obserwacja może być punktem wyjścia do dalszych badań. **Po raz pierwszy zaobserwowano zjawisko antagonistycznego związku między ciprofloksacyną i gentamycyną.** Podsumowując nasze badania, jeden antybiotyk może prowadzić do licznych krzyżowych oporności pojawiających się wśród szczepów *E. coli*. Wszystkie cztery antybiotyki indukowały oporność na inne antybiotyki ze wszystkich 6 analizowanych klas, z wyjątkiem ciprofloksacyny, która nie indukowała oporności na aminoglikozydy i imipenem. Jak wspomniano powyżej – może to wynikać z różnych mechanizmów oporności na leki, które mogą być indukowane przez odpowiedź na stres komórki *E. coli*. Stres indukowany antybiotykiem wewnątrz komórki bakteryjnej może zmieniać profil ekspresji genów i regulować różne szlaki metaboliczne, może mieć również wpływ na właściwości wirulencji bakterii (Horinouchi i wsp., 2017; Atac i wsp., 2018).

Kolejnym ważnym etapem naszego badania było sprawdzenie, w jakim stopniu antybiotyki są w stanie wpływać na geny wirulencji szczepów UPEC. Już dawno udowodniono, że oporność na antybiotyki koreluje z pewnymi cechami bakteryjnymi, korelację tę obserwuje się zwłaszcza między fluorochinolonami, a zjadliwością bakteryjną (Martinez-Martinez i wsp., 1999; Soto i wsp. 2006; Da Silva i Mendonça, 2012). W naszych badaniach analizowano występowanie i ekspresję 6 genów kodujących czynniki wirulencji (*papC*, *sfaE/D*, *cnf1*, *usp*, *fimG/H*, *hlyA*). Geny te (z wyjątkiem *fimG/H*) są opisywane w literaturze jako specyficzne dla szczepów UPEC (Yuri i wsp., 1998). Interesujące jest to, że obecność specyficznych genów związanych z wirulencją i głęboka kompleksowa analiza filogenetyczna wskazuje na wyodrębnienie szczepów UPEC od komensalnych i jelitowych patogennych szczepów *E. coli* (Dobrindt i wsp., 2003; Elena i wsp., 2005; Brzuszkiewicz i wsp., 2006). Większość tych genów uowirulencji jest przenoszona na Wyspach Patogenności (PAI) (Kao i wsp., 1997; Dobrindt i wsp., 2002; Kurazono i wsp., 2003). Jeden z analizowanych genów - *fimG/H*, koduje podjednostkę fimbrii typu I. Rola tej fimbrii w procesie adhezji bakteryjnej we wczesnym stadium ZUM jest bardzo istotna ale jest również obecna w większości szczepów *E. coli* i jest kodowana chromosomalnie (Bahrani-Mougeot i wsp., 2002). Jej stabilna pozycja w genomie *E. coli* wydaje się być ważna dla zapewnienia zasadniczych właściwości adhezyjnych. Prawdopodobnie to było powodem zatrzymania genu *fimG/H* we wszystkich

mutantach *E. coli* w naszym badaniu. Fimbrię typu I można raczej traktować jako czynnik, który nadaje bakterii „sprawność fizyczną”, a nie chorobotwórczość (Dobrindt i wsp., 2003). W przypadku pozostałych genów wirulencji – tylko ciprofloksacyna indukowała ich utratę. Wspomniany wcześniej tylko jeden szczep *E. coli* nie uzyskał oporności na ciprofloksacynę, co było równoważne z zachowaniem wszystkich genów wirulencji. Może to oznaczać utratę właściwości mobilnych wysp patogenności i stabilizację tych genów w chromosomie. Pozostałe szczepy *E. coli* traciły geny wirulencji już po pierwszym pasażu, ale ogólnie tempo i profil utraty genów było zróżnicowane. Może to być związane z obecnością badanych genów na różnych wyspach patogenności, różnorodnym wyposażeniem w ruchome elementy genetyczne lub wydajnością systemów naprawy DNA w genomie bakteryjnym. Mimo, że często opisywano korelację między obecnością genów wirulencji i oporności/wrażliwości na antybiotyki, wpływ długotrwałej presji subletalnych stężeń antybiotyków na szczepy UPEC nie został wyjaśniony. Niektóre źródła wskazują, że mechanizmy naprawy DNA są związane z tym zjawiskiem. Podobne badania przedstawili Soto i wsp. (2006), zaobserwowali oni również jednoczesną utratę *hly* i *cnf1* we wszystkich badanych szczepach UPEC tuż po pierwszym pasażu. W przeciwieństwie do naszych wyników nie zaobserwowali utraty genów *pap* i *sfa*. Sanchez-Cespedes i wsp. (2015) zaobserwowali, że mutacja *gyrA* zmniejszyła ekspresję genów wirulencji t. j. *fimA*, *papA*, *papB* i *ompA*. Mechanizm ten jest prawdopodobnie związany ze zmianą topologii DNA, która zakłóca normalny proces ekspresji genów. Ważną rolę odgrywa tu ekspresja gyrazy, która może rozluźnić helisę DNA i prowadzić do mutacji w genomie bakteryjnym za pomocą systemów naprawy DNA (Hsu i wsp., 2006). Niektórzy autorzy wskazują, że do utraty genów wirulencji indukowanej przez ciprofloksacynę nie jest konieczna aktywacja systemu naprawy DNA SOS (Goneau i wsp., 2015; Sanchez-Cespedes i wsp., 2015). Być może wynika to z uruchomienia innych mechanizmów naprawy DNA, takich jak mechanizm naprawy pęknięć podwójnej nici DNA, mechanizm naprawy źle sparowanych zasad lub mechanizm odpowiedzi na stres (Zgur-Bertok i wsp., 2013; Schroeder i wsp., 2017). Być może warto wziąć pod uwagę, że różne sekwencje DNA ruchomych elementów na różnych wyspach patogenności mogą mieć znaczenie dla tego zjawiska.

Dalsze badania obejmowały wpływ antybiotyku na tworzenie biofilmu. Podobne badania były już opisywane ale dotyczyły analizy w czasie rzeczywistym inkubacji bakterii z antybiotykiem (Ranieri i wsp., 2018). **Po raz pierwszy prezentujemy, jak antybiotyk może trwale zmienić zdolność do tworzenia biofilmu wśród szczepów UPEC.** Wykazano, że jedynie mutanty *E. coli* indukowane amoksycyliną wykazały statystycznie istotny wyższy poziom tworzenia biofilmu i co ważne, nie zależał on od gęstości komórek planktonicznych w bulionie. Co należy podkreślić – **szczepy dzikie *E. coli* wykazywały bardzo niski poziom tworzenia biofilmu, natomiast po działaniu amoksycyliną - ich mutanty wykazały do 4 razy silniejszy biofilm. Może to wskazywać, że tworzenie się biofilmu może być indukowane przez amoksycylinę nawet w szczepach niezdolnych do tworzenia biofilmu.** Sytuacja ta może być bardzo niekorzystna podczas leczenia ZUM, gdzie subletalne dawki amoksycyliny w drogach moczowych mogą prowadzić nie tylko do selekcji komórek opornych, ale ułatwiać adhezję

bakterii do tkanki nabłonka pęcherza moczowego gospodarza i pomagać w rozwoju biofilmu bakteryjnego. Amoksycylina należy do antybiotyków, które wpływają na strukturę ściany komórkowej bakterii i wywołują stres bakteryjny, który może stymulować tworzenie biofilmu (Kaplan, 2011). Zmiany powierzchni komórek bakteryjnych mogą mieć wpływ na ich hydrofobowość, a w konsekwencji na tworzenie biofilmu. Podobne badania *in vivo* przeprowadzone przez Goneau i wsp. (2015) udowodniły, że subinhibicyjne stężenia antybiotyków (ciprofloksacyna, ampicylina i gentamycyna) modulowały wirulencję między innymi *Escherichia coli*. Indukcja ekspresji genów kodujących adhezyny spowodowała wzrost tworzenia biofilmu, kolonizację mysiego pęcherza moczowego i nerek oraz promowała rozwój wewnątrzkomórkowego biofilmu. Podobne obserwacje w badaniach *in vitro* u innych gatunków bakterii zostały również opisane w literaturze (Erdeljan i wsp., 2012; Mlynek i wsp., 2016). Biorąc pod uwagę nasze wyniki – krzywe wzrostu mutantów nie zostały zakłócone, więc wzrost tworzenia biofilmu nie wynikał z gęstości czy rozpadu komórek bakteryjnych. Mlynek i wsp. (2016) sugerują, że amoksycylina stymuluje pozakomórkowe tworzenie biofilmu zależnego od DNA u bakterii, co może odzwierciedlać adaptację ściany komórkowej do stresu środowiskowego. **Podsumowując, inni autorzy wykazali stymulację tworzenia biofilmu podczas inkubacji z antybiotykiem betalaktamowym, podczas gdy nasze wyniki przedstawiają wyindukowany stały wzrost tworzenia biofilmu po działaniu amoksycyliną. Należy podkreślić, że mutanty kontynuowały wzrost tworzenia biofilmu w kolejnych dniach pasażowania hodowli pozbawionej antybiotyku, co może sugerować indukcję ekspresji pewnych specyficznych genów i w dalszej konsekwencji nadekspresję.**

Na finalnym etapie badań przedstawionych w ostatniej publikacji mutanty i ich szczepy dzikie *E. coli* poddano genotypowaniu za pomocą wcześniej opracowanej techniki CGG-PCR (Adamus-Białek i wsp., 2009). Ta technika odwzorowuje genetyczne „odciski palców” badanych szczepów. Udowodniliśmy wcześniej, że zaprojektowana technika CGG-PCR pozwala na różnicowanie klinicznych szczepów *E. coli* wyizolowanych z moczu na dwie grupy o różnej patogenności. Z drugiej strony CGG-PCR wskazuje subtelne różnice specyficzne dla poszczególnych szczepów. Podążając za tymi osiągnięciami, chcieliśmy przyjrzeć się profilowi genetycznemu mutantów *E. coli* przy użyciu tej samej metody. **Wzorce produktów CGG-PCR zostały zachowane w mutantach *E. coli* w porównaniu z ich szczepami typu dzikiego, ale różnice obserwowano przez ujawnienie lub zanik pojedynczych prążków w obrazie elektroforetycznym.** Różnice te były najbardziej widoczne w przypadku mutantów indukowanych ciprofloksacyną, zwłaszcza gdy obserwowano również utratę genów wirulencji. Niewielkie różnice obserwowano również po działaniu amoksycyliną. Odkrycia te są uzasadnione ze względu na silny wpływ ciprofloksacyny na strukturę i metabolizm DNA (Hsu i wsp., 2006; Soto i wsp., 2006; Goneau i wsp., 2015). Zdolność amoksycyliny do indukowania wolnych rodników może również wpływać na DNA ale już w mniejszym stopniu (Miller i wsp., 2004). **Stabilne wzorce prążków DNA w przypadku mutantów indukowanych aminoglikozydami wynikają z braku wpływu aminoglikozydów na strukturę DNA.** Warto dodać, że **obserwowane zmiany we wzorcach produktów CGG-PCR były indukowane przez antybiotyki, ponieważ nie zaobserwowano żadnych**

zmian po pasażach hodowli bakterii w optymalnych warunkach. Metoda genotypowania za pomocą MLEE lub rybotypowania rDNA za pomocą RFLP to standardy stosowane w różnicowaniu bakterii, jednak wymagają one dużego doświadczenia laboratoryjnego i nie są w stanie różnicować patogenności bakteryjnej (Silveira i wsp., 2001). **Wyniki naszych badań potwierdzają poprzedni wniosek, że CGG-PCR może być użyteczną techniką do badania epidemiologicznego pokrewieństwa między szczepami *E. coli*.**

Podsumowując, prezentowanie wyniki badań dostarczają szerokiego opisu korelacji między subinhibicyjnym stężeniem antybiotyków, zmianami w profilach lekooporności, nabywaniem oporności krzyżowej i antagonistycznym działaniem antybiotyków. Dodatkowo wykazano wpływ antybiotyków na utratę genów wirulencji i wzrost tworzenia biofilmu wśród szczepów UPEC. Największe i najbardziej stabilne zmiany zaobserwowano w przypadku ciprofloksacyny, co potwierdza, że ciprofloksacyna ma silny wpływ na metabolizm DNA i/lub aktywuje inne szlaki metaboliczne, które bakterie wykorzystują do adaptacji w niekorzystnych warunkach środowiska. Działanie bakteriobójcze było najbardziej stabilne w przypadku aminoglikozydów. Niestety, aminoglikozydy powodują najliczniejsze i najsilniejsze działania niepożądane u ludzi w porównaniu z fluorochinolonami i betalaktamami. Nasze badania pokazują jak złożony wpływ mają antybiotyki na uropatogenne szczepy *E. coli*. Ta grupa patogenów wykazuje wysoką zdolność do oporności na nowoczesne terapie. Często są odpowiedzialne za nawracające infekcje, jak również szybkie narastanie lekooporności (Durkin i wsp., 2018). Zdolność UPEC do tworzenia wewnątrzkomórkowego biofilmu jest sposobem na długotrwałą obecności w drogach moczowych zakażonych pacjentów, co może prowadzić do poważnego uszkodzenia tego układu. Zrozumienie mechanizmów oporności na antybiotyki szczepów UPEC jest szansą na opracowanie lepszych terapii. Może to prowadzić zarówno do korzyści zdrowotnych, jak i ekonomicznych, a przedstawione wyniki są ważnym sygnałem do refleksji nad restrykcyjnym stosowaniem antybiotyków.

4.3.3. PODSUMOWANIE I PRZYSZŁE CELE NAUKOWE

Zakres badań włączonych do przedstawionego osiągnięcia naukowego dotyczył szczegółowej analizy szczepów *Escherichia coli* wyizolowanych z moczu pacjentów ze zdiagnozowanym zakażeniem układu moczowego. Definiowanie badanej kolekcji szczepów *E. coli* jako szczepy uropatogenne według mnie jest nieadekwatne. Uropatogenność to zdolność bakterii do infekcji układu moczowego, jednak znanych jest wiele czynników predysponujących do zakażenia niezależnych od bakterii. Uzyskane wyniki badań sugerują, że badana grupa szczepów *E. coli* jest heterogenną grupą bakterii, wykazującą zróżnicowane właściwości pod względem oporności na antybiotyki, zdolności do tworzenia biofilmu i występowania specyficznych genów.

W badaniach nad szczepami *E. coli* wyizolowanymi z moczu pacjentów ze zdiagnozowanym ZUM:

- Zastosowano nowatorskie podejście w szczegółowej analizie lekooporności i badaniu złożonych korelacji wykorzystując zaawansowane narzędzia matematyczne.
- Analizowano zdolność do przeżycia *E. coli* w trudnych warunkach środowiska: mocz, wolne rodniki, subinhibicyjne stężenia antybiotyków.
- Określono rolę biofilmu i produkcji celulozy w procesie adaptacji do trudnych warunków środowiska (mocz, wolne rodniki).
- Określono wpływ ciprofloksacyny, amoksycyliny i aminoglikozydów na zmienność genetyczną i fenotypową szczepów uropatogennych *E. coli*.

Za najważniejsze osiągnięcia w przedstawionym cyklu publikacji uważam następujące wnioski:

- badana kolekcja szczepów *E. coli* izolowanych z moczu to heterogenna grupa bakterii wykazująca bardzo duże zróżnicowanie w profilach lekooporności, wirulencji i zdolności do tworzenia biofilmu,
- zastosowanie zaawansowanych narzędzi matematycznych w badaniu głębokich zależności pomiędzy antybiotykami i szczepami bakteryjnymi w analizie lekooporności posiada duży potencjał aplikacyjny,
- zastosowanie analiz matematycznych może być wykorzystane w racjonalnej antybiotykoterapii i badaniach epidemiologicznych,
- występowanie badanych genów lekooporności nie pełni roli markera fenotypowej oporności na antybiotyki betalaktamowe, aminoglikozydy i sulfonamidy,
- analiza mutacji w genach *gyrA* i *parC* może stanowić czynnik predykcyjny w monitorowaniu lekooporności na antybiotyki fluorochinolonowe,
- nagromadzenie niespecyficznych mutacji w genach *gyrA* i *parC* zmniejsza wrażliwość na fluorochinolony,
- w hodowli *E. coli* w sztucznym moczu lub obecności wolnych rodników wzrost i tworzenie biofilmu są słabsze w porównaniu do warunków optymalnych,
- *E. coli* jest niewrażliwa na wysokie stężenia wody utlenionej, co może oznaczać, że wybuch tlenowy neutrofilii nie działa bakteriobójczo,
- w niekorzystnych warunkach środowiska (mocz, wolne rodniki) szczepy *E. coli* są bardziej zaangażowane w tworzenie biofilmu, niż w podziały komórkowe (wzrost),
- wolne rodniki (uwalniane np. podczas wybuchu tlenowego neutrofilii) stymulują komórki *E. coli* do produkcji celulozy, co może utrudniać leczenie pacjentów cewnikowanych ze względu na zwiększone siły adhezji bakterii do powierzchni cewnika,
- ciprofloksacyna nie jest bezpiecznym antybiotykiem w terapii ZUM, ze względu na bardzo szybkie działanie mutagenne, indukujące oporność krzyżową i zmiany w profilu wirulencji szczepów UPEC,

- amoksycylina nie jest bezpiecznym antybiotykiem w terapii ZUM, ze względu na indukowanie oporności krzyżowej na wiele antybiotyków i stymulowanie do wzmożonego tworzenia biofilmu w przypadku UPEC,
- ciprofloksacyna, aminoglikozydy i amoksycylina wykazują działanie antagonistyczne.

W przyszłości zamierzam kontynuować badania nad uropatogennością szczepów *E. coli*. Tematem badawczym, który planuję rozwijać jest wpływ antybiotyków, głównie fluorochinolonów na niestabilność sekwencji CRISPR/cas. Sekwencje CRISPR/cas pełnią funkcję swoistego mechanizmu obronnego bakterii przeciwko obcemu DNA, głównie wirusowemu. Doniesienia wskazują, że istnieje silny związek obecności sekwencji CRISPR ze zmniejszoną opornością na antybiotyki, co daje podstawy do postawienia hipotezy, że obecność sekwencji CRISPR zmniejsza możliwości adaptacyjne bakterii. W wynikach badań wstępnych okazało się, że w przypadku mutantów *E. coli* z wyindukowaną opornością na ciprofloksacynę doszło do zmiany w profilu sekwencji CRISPR, wyniki tych badań pt. „Factors that influence the genetic stability of CRISPR/cas systems in *Escherichia coli*” były prezentowane na konferencji “Microbiology in Health Care and Environmental Protection” - MIKROBIOT w 2017 roku w Łodzi. Założyłam, że antybiotyki mogą indukować zmiany w tych regionach, co ma konsekwencje w zmianie potencjału wirulencyjnego i adaptacyjnego bakterii *E. coli*. Hipotezę tę zamierzam wyjaśnić w dalszych badaniach, z zamiarem złożenia wniosku grantowego Sonata Bis do NCN.

Moim dodatkowym zainteresowaniem naukowym stały się badania nad genetycznymi uwarunkowaniami chorób metabolicznych, głównie trzustki u ludzi. Pracując w Zakładzie Chirurgii i Pielęgniarstwa Chirurgicznego WLiNoZ UJK zostałam włączona do badań prowadzonych przez wiele lat przez Profesora dr hab. Stanisława Głuszka oraz Jego Zespół. Dostęp do obszernego materiału klinicznego (ponad 1256 próbek materiału klinicznego pobranego od osób zdrowych i z chorobami trzustki) jest doskonałym źródłem do poszerzania horyzontów naukowych oraz możliwości badawczych. W związku z rozpoczęciem nowych kierunków badań zostałam promotorem pomocniczym pracy doktorskiej, gdzie poszukujemy nowych markerów genetycznych zapalenia trzustki, ze szczególnym uwzględnieniem roli genu karboksypeptydazy. Brałam również udział w badaniach nad uwarunkowaniami genetycznymi Zespołu Metabolicznego, a pierwsze efekty współpracy zostały przedstawione w pracy Suliga E., Koziół D., Cieśla E., Rębak D., Wawszczak M., Adamus-Białek W., Naszydlowska E., Piechowska A., Głuszek S., Omentin rs2274907 gene polymorphism and the risk of metabolic syndrome: a preliminary report, *Medical Studies*, 2018; 34(4): 267–275. Wyniki pozyskanych prac badawczych były także prezentowane na konferencjach naukowych w 2018 roku. Doświadczenie w zakresie mikrobiologii dało mi również możliwość objęcia funkcji promotora pomocniczego kolejnego Doktoranta, prowadzącego badania nad czynnikami determinującymi występowanie *Listeria sp.* w szpitalach i domach pomocy społecznej. Mam nadzieję, że będzie to kolejna gałąź nowej, ciekawej współpracy naukowej.

4.3.4. LITERATURA

1. Adamus-Bialek W, Wojtasik A, Majchrzak M, et al. (2009) (CGG)₄-based PCR as a novel tool for discrimination of uropathogenic *Escherichia coli* strains: comparison with enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR. *J Clin Microbiol*, 47(12):3937-44.
2. Adamus-Bialek W, Kubiak A, Czerwonka G (2015) Analysis of uropathogenic *Escherichia coli* biofilm formation under different growth conditions. *Acta Biochim Pol*, 62 (4):765–771.
3. Adamus-Bialek W, Lechowicz Ł, Kubiak-Szeligowska A, et al. (2017) A new look at the drug-resistance investigation of uropathogenic *E. coli* strains; *Mol Biol Rep*, 44(1):191-202,
4. Agace WW (1996) The role of the epithelial cell in *Escherichia coli* induced neutrophil migration into the urinary tract. *Eur Respir J*, 9:1713–1728.
5. Agashe D, Sane M, Phalnikar K, et al. (2016) Large-effect beneficial synonymous mutations mediate rapid and parallel adaptation in a bacterium. *Mol Biol Evol*, 33(6):1542–1553.
6. Alizade H, Fallah F, Ghanbarpour R, et al. (2015) Phylogenetic groups, extended-spectrum β -lactamases and metallo- β -lactamase in *Escherichia coli* isolated from fecal samples of patients with diarrhea in Iran. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 8(3):207–214
7. Anderson GG, Dodson KW, Hooton TM, et al. (2004) Intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Trends Microbiol*, 12:424–430.
8. Atac N, Kurt-Azap O, Dolapci I, et al. (2018) The Role of AcrAB–TolC Efflux Pumps on Quinolone Resistance of *E. coli* ST131. *Curr Microb*, 75(12)1661–1666.
9. Baharoglu Z, Mazel D (2011) *Vibrio cholerae* triggers SOS and mutagenesis in response to a wide range of antibiotics: a route towards multiresistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(5):2438–2441.
10. Bahrani-Mougeot FK, Buckles EL, Lockett CV, et al. (2002) Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants in the murine urinary tract. *Mol Microbiol*, 45(4):1079-93.
11. Bailey JK, Pinyon JL, Anantham S, et al. (2011) Distribution of the blaTEM gene and blaTEM-containing transposons in commensal *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*, 66:745–751
12. Bergsten G, Wullta B, Svanborg C (2005) *Escherichia coli*, fimbriae, bacterial persistence and host response induction in the human urinary tract. *Int J Med Microbiol*, 295:487–502.
13. Bian Z, Brauner A, Li Y, Normark S (2000) Expression of and cytokine activation by *Escherichia coli* curli fibers in human sepsis. *J Infect Dis*, 181:602–612.
14. Blomgran R, Zheng L, Stendahl O (2004) Uropathogenic *Escherichia coli* triggers oxygen-dependent apoptosis in human neutrophils through the cooperative effect of type 1 fimbriae and lipopolysaccharide. *Infect Immun*, 72:4570–4578.
15. Brzuszkiewicz E, Bruggemann H, Liesegang H, et al. (2006) How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103:12879-12884.
16. Camelena F, Birgy A, Smail Y, et al. (2019) Rapid and simple universal *Escherichia coli* genotyping method based on Multiple-Locus Variable-Number of Tandem Repeats Analysis using single-tube multiplex PCR and standard gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*, pii:AEM.02812-18
17. Canton R, Coque TM (2006) The CTX-M- β -lactamase pandemic. *Curr Opt Microbiol*, 9:466–475.
18. Cardenas DD, Hoffman JM (2009) Hydrophilic catheters versus noncoated catheters for reducing the incidence of urinary tract infections: a randomized controlled trial. *Arch Phys Med Rehabil* 90(10):1668–1671.
19. Caron F, Wehrle V, Etienne M (2017) The comeback of trimethoprim in France. *Med Mal Infect*, 47(4):253–260.
20. Cesaro A, Bettoni R, Lascols C, et al. (2008) Low selection of topoisomerase mutants from strains of *Escherichia coli* harbouring plasmid-borne qnr genes. *J Antimicrob Chemother*, 61(5):1007–1015.
21. Chang TM, Lu PL, Li HH, et al. (2007) Characterization of fluoroquinolone resistance mechanisms and their correlation with the degree of resistance to clinically used fluoroquinolones among *Escherichia coli* isolates. *J Chemother*, 19(5):488-94.
22. Cirz RT, Chin JK, Andes DR, et al. (2005) Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance. *PLoS Biol*, 3(6):e176.
23. Da Silva GJ, Mendonça N. (2012) Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. *Virulence*, 3:18-28.
24. De Silva BCJ, Hossain S, Wimalasena SHMP, et al. (2017) Quinolone susceptibility and genetic characterization of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolated from pet turtles. *Lab Anim Res*, 33(2):49–56.
25. Dobrindt U, Blum-Oehler G, Nagy G, et al. (2002) Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands (PAI I(536) to PAI IV(536)) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect Immun*, 70(11):6365-72.

26. Dobrindt U, Agerer F, Michaelis K, et al. (2003) Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. *J Bacteriol*, 185(6):1831-40.
27. Dobrindt U (2005) (Patho-)Genomics of *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* 295:357-371.
28. Durkin MJ, Keller M, Butler AM, et al. (2018) An Assessment of Inappropriate Antibiotic Use and Guideline Adherence for Uncomplicated Urinary Tract Infections. *Open Forum Infect Dis*, 10;5(9):ofy198.
29. Elena SF, Whittam TS, Winkworth CL, Riley MA, Lenski RE (2005) Genomic divergence of *Escherichia coli* strains: evidence for horizontal transfer and variation in mutation rates. *Int Microbiol*, 8:271-278.
30. Erdeljan P, MacDonald KW, Goneau LW, et al. (2012) Effects of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin on *Staphylococcus saprophyticus* adherence and virulence in urinary tract infections. *J Endourol*, 26(1):32-7.
31. Fabrega A, du Merle L, Le Bouguenec C, et al. (2009) Repression of invasion genes and decreased invasion in a high-level fluoroquinolone-resistant *Salmonella typhimurium* mutant. *PLoS One*, 4(11):e8029.
32. Fey PD, Safranek TJ, Rupp ME, et al. (2000) Ceftriaxone-resistant salmonella infection acquired by a child from cattle. *N Engl J Med.*, 342(17):1242-1249
33. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, et al. (2005) Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol*, 13:34-40.
34. García-Martínez J, Maldonado RD, Guzmán NM, et al. (2018) The CRISPR conundrum: evolve and maybe die, or survive and risk stagnation. *Microb Cell*, 16;5(6):262-268
35. Gerven VN, Van der Verren SE, Reiter DM, et al. (2018) The role of functional amyloids in bacterial virulence. *J Mol Biol*, 430(20):3657-3684.
36. Gniadkowski M, Schneider I, Pałucha A, et al. (1998) Cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolates from a hospital in Warsaw, Poland: identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*, 42(4):827-832
37. Gonçalves S, Rodrigues IP, Padrão J, et al. (2016) Acetylated bacterial cellulose coated with urinary bladder matrix as a substrate for retinal pigment epithelium. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 139:1-9.
38. Goneau LW, Hannan TJ, MacPhee RA, et al. (2015) Subinhibitory antibiotic therapy alters recurrent urinary tract infection pathogenesis through modulation of bacterial virulence and host immunity. *MBio*, 31;6(2).
39. Grape M, Sundström L, Kronvall G (2003) Sulphonamide resistance gene *sul3* found in *Escherichia coli* isolates from human sources. *J Antimicrob Chemother*, 52:1022-1024.
40. Grover SS, Doda A, Gupta N, et al. (2017) New Delhi metallo- β -lactamase - type carbapenemases producing *Escherichia coli* isolates from hospitalized patients: A pilot study. *Indian J Med Res*, 146(1):105-110.
41. Haldorsen BC, Simonsen GS, Sundsfjord A, et al. (2014) Increased prevalence of aminoglycoside resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Norway is associated with the acquisition of AAC(3)-II and AAC(6')-Ib. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 78(1):66-69.
42. Halliwell B, Clement MV, Long LH (2000) Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett*, 486:10-13.
43. Hannan TJ, Totsika M, Mansfield KJ, et al. (2012) Host-pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic *E. coli* bladder infection. *FEMS Microbiol Rev*, 36:616-648.
44. Hauber DJ, Grogan DW, DeBry RW (2016) Mutations to less-preferred synonymous codons in a highly expressed gene of *Escherichia coli*: fitness and epistatic interactions. *PLoS ONE*, 11(1):e0146375.
45. Horinouchi T, Suzuki S, Kotani H, et al. (2017) Prediction of Cross-resistance and Collateral Sensitivity by Gene Expression profiles and Genomic Mutations. *Sci Rep*, 7(1):14009.
46. Hsu YH, Chung MW, Li TK. (2006) Distribution of gyrase and topoisomerase IV on bacterial nucleoid: implications for nucleoid organization. *Nucleic Acids Res*, 34(10):3128-38.
47. Hunstad DA, Justice SS. (2010) Intracellular lifestyles and immune evasion strategies of uropathogenic *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol*, 64:203-221.
48. Huovinen P, Sundstrom L, Swedberg G, et al. (1995) Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob Agent Chemother*, 39(2):279-289
49. Ito A, May T, Kawata K, et al. (2007) Significance of *rpoS* during maturation of *Escherichia coli* biofilms. *Biotechnol Bioeng*, 99:1462-1471.
50. Jacoby GA. (2009) AmpC β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev*, 22(1):161-82.
51. Jlili NEH, R'ejiba S, Smaoui H et al (2014) Trend of plasmid mediated quinolone resistance gene *sat* the Children's Hospital in Tunisia. *J Med Microbiol* 63(2):195-202.
52. Justice SS, Hung C, Theriot JA, et al. (2004) Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci*, 101:1333-1338.
53. Kai-Larsen Y, Luthje P, Chromek M, et al. (2010) Uropathogenic *Escherichia coli* modulates immune responses and its curli fimbriae interact with the antimicrobial peptide LL-37. *PLoS Pathog*, 6:1-16.
54. Kallen A, Welch HG, Sirovich BE (2006) Current antibiotic therapy for isolated urinary tract infections in women. *Arch Intern Med*, 166(6):635-639
55. Kao JS, Stucker DM, Warren JW, et al. (1997) Pathogenicity island sequences of pyelonephritogenic *Escherichia coli* CFT073 are associated with virulent uropathogenic strains. *Infect. Immun*, 65:2812-2820.
56. Kaplan JB. (2011) Antibiotic-induced biofilm formation. *Int. J. Artif. Organs*, 34:737-751.

57. Koeck JL, Arlet G, Philippon A, et al. (1997) A plasmid-mediated CMY-2 beta-lactamase from an Algerian clinical isolate of *Salmonella* senftenberg. *FEMS Microbiol Lett*, 152(2):255–260
58. Konca C, Tekin M, Uckardes F, et al. (2016) An overview of antibacterial resistance patterns of pediatric community-acquired urinary infections. *Pediatr Int*. doi:10.1111/ped.1313
59. Korzeniewska E, Korzeniewska A, Harnisz M (2013) Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. *Ecotoxicol Environ Saf*, 91:96–102.
60. Krasowska A, Sigler K (2014) How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? *Front Cell Infect Microbiol*, 4:112.
61. Kurazono H, Nakano M, Yamamoto S, et al. (2003) Distribution of the *usp* gene in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from companion animals and correlation with serotypes and size-variations of the pathogenicity island. *Microbiol Immunol*, 47:797-802.
62. Liao K, Chen Y, Wang M, et al. (2017) Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* causing intra-abdominal infections from 9 tertiary hospitals in China. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 87(1):45–48.
63. Liu Y, Yang S, Xu H (2004) The influence of cell and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment. *J Biotechnol*, 110:251–256.
64. Long LH, Evans PJ, Halliwell B (1999) Hydrogen Peroxide in human urine: implications for antioxidant defense and redox regulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 262:605–609.
65. Ma Q, Wood TK (2009) OmpA influences *Escherichia coli* biofilm formation by repressing cellulose production through the CpxRA two-component system. *Environ Microbiol*, 11(10):2735–2746.
66. Mammeri H, Loo M, Poirel L, et al. (2005) Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrob Agent Chemother*, 49(1):71-6.
67. Marquet A, Vibet MA, Caillon J, et al. (2018) Is There an Association Between Use of Amoxicillin-Clavulanate and Resistance to Third-Generation Cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* at the Hospital Level? *Microb Drug Resist*, 24(7):987-994.
68. Martinez-Martinez L, Fernandez F, Perea EJ. (1999) Relationship between haemolysis production and resistance to fluoroquinolones among clinical isolates of *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother*, 43:277–279.
69. Matuschek E, Brown DFJ, Kahlmeter G (2014) Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect*, 20(4):O255–O266
70. McDonald LC, Chen FJ, Lo HJ, et al. (2001) Emergence of reduced susceptibility and resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* in Taiwan and contributions of distinct selective pressures. *Antimicrob Agents Chemother*, 45:3084–3091
71. Miller C, Thomsen LE, Gaggero C, et al. (2004) SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science*, 305(5690):1629–163.
72. Miyazaki J, Ba-Thein W, Kumao T, et al. (2002) Type 1, P and S fimbriae, and afimbrial adhesin I are not essential for uropathogenic *Escherichia coli* to adhere to and invade bladder epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 33:23-26.
73. Mlynek KD, Callahan MT, Shimkevitch AV, et al. (2016) Effects of Low-Dose Amoxicillin on *Staphylococcus aureus* USA300 Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 22;60(5):2639-51.
74. Norinder BS, Luthje P, Yadav M, et al. (2011) Cellulose and PapG are important for *Escherichia coli* causing recurrent urinary tract infection in women. *Infection*, 39:571–574.
75. Obolski U, Dellus-Gur E, Stein GY, et al. (2016) Antibiotic cross-resistance in the lab and resistance co-occurrence in the clinic: discrepancies and implications in *E.coli*. *Infect Genet Evol* 40:155–161.
76. Ojdana D, Sacha P, Wieczorek P, et al. (2014) The occurrence of blaCTX-M, blaSHV, and blaTEM genes in extended-spectrum β -lactamase-positive strains of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* in Poland. *Int J Antibiot*, <https://doi.org/10.1155/2014/93584> 2
77. Parajuli NP, Maharjan P, Parajuli H, et al. (2017) High rates of multidrug resistance among uropathogenic *Escherichia coli* in children and analyses of ESBL producers from Nepal. *Antimicrob Resist Infect Control*, 11:6–9.
78. Peterson E, Kaur P. (2018) Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Front Microbiol*, 30;9:2928
79. Rahman M, Mukhopadhyay C, Rai RP, et al. (2018) Novel variant NDM-11 and other NDM-1 variants in multidrug-resistant *Escherichia coli* from South India. *J Glob Antimicrob Resist*, 14:154-157.
80. Ranieri MR, Whitchurch CB, Burrows LL. (2018) Mechanisms of biofilm stimulation by subinhibitory concentrations of antimicrobials. *Curr Opin Microbiol*, 24;45:164-169.
81. Ranjit DK, Young KD (2013) The Res Stress response and accessory envelope proteins are required for de novo generation of cell shape in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 195:2452–2462.

82. Rognoni C, Tarricone R (2017) Intermittent catheterisation with hydrophilic and nonhydrophilic urinary catheters: systematic literature review and meta-analyses. *BMC Urol*, 17(1):4.
83. Saito R, Sato K, Kumita W, et al. (2006) Role of type II topoisomerase mutations and AcrAB efflux pump in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Proteus mirabilis*. *J Antimicrob Chemother*, 58(3):673-7.
84. Sanchez-Céspedes J, Sáez-López E, Frimodt-Møller N, et al. (2015) Effects of a mutation in the *gyrA* gene on the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(8):4662–4668
85. Schembri MA, Hjerrild L, Gjermansen M, et al. (2003) Differential expression of the *Escherichia coli* autoaggregation factor antigen 43. *J Bacteriol*, 185(7):2236–2242.
86. Schembri MA, Kjaergaard K, Klemm P (2003) Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol*, 48:253–267.
87. Schroeder M, Brooks BD, Brooks AE. (2017) The Complex Relationship between Virulence and Antibiotic Resistance. *Genes (Basel)*, 18;8(1).
88. Serpersu EH, Ozen C, Wright E. (2008) Studies of enzymes that cause resistance to aminoglycosides antibiotics. *Methods Mol Med*, 142:261-71.
89. Shahi SK, Singh VK, Kumar A (2013) Detection of *Escherichia coli* and associated β -lactamases genes from diabetic foot ulcers by multiplex PCR and molecular modeling and docking of SHV-1, TEM-1, and OXA-1 β -lactamases with clindamycin and piperacillin-tazobactam. *PLoS ONE*, 8(7):e68234
90. Silveira WD, Benetti F, Lancellotti M, et al. (2001) Biological and genetic characteristics of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Rev Inst Med Trop*, 43:303-310.
91. Sköld O (2001) Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet Res*, 32:261–273.
92. Sokurenko E (2016) Pathoadaptive Mutations in Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr*, 4(2)
93. Soleimani N, Aganj M, Ali L, Shokoozhadeh L, et al. (2014) Frequency distribution of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes in uropathogenic *E. coli* isolated from Iranian hospital. *BMC Res Notes*, 7:842.
94. Soto SM, Jimenez de Anta MT, Vila J (2006) Quinolones induce partial or total loss of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* by SOS-dependent or -independent pathways, respectively. *Antimicrob Agents Chemother*, 50(2):649-53.
95. Spiers AJ, Bohannon J, Gehrig SM, et al. (2003) Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Mol Microbiol* 50:15–27.
96. Stefaniuk E, Suchocka U, Bosacka K, et al. (2016) Etiology and antibiotic susceptibility of bacterial pathogens responsible for community-acquired urinary tract infections in Poland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 35:1363–1369.
97. Subashchandrabose S, Mobley HLT (2015) Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr*, 3(4)
98. Supek F (2016) The code of silence: widespread associations between synonymous codon biases and gene function. *J Mol Evol*, 82(1):65–73.
99. Suzuki S, Horinouchi T, Furusawa C. (2014) Prediction of antibiotic resistance by gene expression profiles. *Nat Commun*, 5:5792.
100. Terlizzi ME, Griboaldo G, Maffei ME (2017) UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. *Front Microbiol*, 8:1566
101. Thong KL, Ngoi ST, Chai LC, et al. (2016) Quinolone resistance mechanisms among *Salmonella enterica* in Malaysia. *Microb Drug Resist*, 22(4):259–272.
102. Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC (2005) Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein QnrA with *Escherichia coli* topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(7):3050–3052.
103. Trautner BW. (2018) Fluoroquinolones for urinary tract infection and within-household spread of resistant Enterobacteriaceae: the smoking gun. *Clin Microbiol Infect*, 24(9):929-930.
104. Wei J, Lee JM, Smulski DR, et al. (2001) Global impact of *sdiA* amplification revealed by comprehensive gene expression profiling of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 183:2265–2272.
105. Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA (2008) Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol*, 85(1):11-9.
106. Williams DH, Schaeffer AJ (2004) Current concepts in urinary tract infections. *Minerva Urol Nefrol*, 56:15-31.
107. Winokur PL, Brueggemann A, DeSalvo DL, et al. (2000) Animal and human multidrug-resistant, cephalosporin-resistant salmonella isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC beta- lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*, 44(10):2777–2783
108. Winokur PL, Vonstein DL, Hoffman LJ, et al. (2001) Evidence for transfer of CMY-2 AmpC β -lactamase plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and humans. *Antimicrob Agent Chemother*, 45(10):2716–2722

109. van der Bij K, van Dijk K, Muilwijk J, et al. (2012) Clinical breakpoint changes and their impact on surveillance of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* causing bacteraemia. *Clin Microbiol Infect*, 18:E466–E472.
110. Zhanel GG, Hoban DJ, Harding GK (1992) Subinhibitory antimicrobial concentrations: A review of in vitro and in vivo data. *Can J Infect Dis*, 3(4):193-201.
111. Yang W, Zhang M, Zhou J, et al. (2017) The molecular mechanisms of ciprofloxacin resistance in clinical *Campylobacter jejuni* and their genotyping characteristics in Beijing. *China Foodborne Pathog Dis*, 4(7):386–392.
112. Yayan J, Ghebremedhin B, Rasche K. (2015) No Development of Imipenem Resistance in Pneumonia Caused by *Escherichia coli*. *Medicine (Baltimore)*, 94(25):e1020.
113. Yuri K, Nakata K, Katae H, et al. (1998) Distribution of uropathogenic virulence factors among *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats. *Vet Med Sci*, 60(3):287-90.
114. Zgur-Bertok D. (2013) DNA Damage Repair and Bacterial Pathogens. *PLoS Pathog*, 9(11): e1003711.
115. Zhang W, Sun J, Ding W, et al. (2015) Extracellular matrix-associated proteins form an integral and dynamic system during *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Front Cell Infect Microbiol*, 5:40.
116. Zhou G, Mo WJ, Sebbel P, et al., (2001) Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: evidence from in vitro FimH binding. *J Cell Sci*, 114(22):4095–4103.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

5.1. Realizowane tematy badawcze

Poza przedstawionym cyklem publikacji, wyszczególnionym w osiągnięciu naukowym jestem współautorem 12 publikacji oryginalnych, opublikowanych w recenzowanych czasopismach o łącznej liczbie punktów Impact Factor 10,213 (MNiSzW 136). W przypadku 6 prac jestem pierwszym i korespondencyjnym* autorem. Jestem również współautorem 28 doniesień konferencyjnych o zasięgu krajowym, międzynarodowym lub zagranicznym. Uzyskane wyniki prowadzonych badań zostały podzielone na pięć obszarów tematycznych, do których przyporządkowane zostały odpowiednie publikacje:

I. Wykorzystanie sekwencji TRS w genotypowaniu i analizie epidemiologicznej bakterii

1. Adamus-Białek W*, Wojtasik A., Majchrzak M., Sosnowski M., Parniewski P., (CGG)4-based PCR as a Novel Tool for Uropathogenic Escherichia coli Discrimination: Comparison with ERIC-PCR, Journal of Clinical Microbiology, 2009, 47(12):3937-44

IF: 4,162; MNiSzW 24

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w tworzeniu koncepcji pracy, przeprowadzeniu części eksperymentalnej, analizie i interpretacji wyników badań, przygotowaniu manuskryptu i jego korekcie po uzyskaniu recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 50%.

2. Wojtasik A., Majchrzak M., Adamus-Białek W., Augustynowicz-Kopec E., Zwolska Z., Dziadek J., Parniewski P., Trinucleotide repeat sequence-based PCR as a potential approach for genotyping Mycobacterium gordonae strains., Journal of Microbiological Methods, 2011, 85(1):28-32

IF: 2,086, MNiSzW 25

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w tworzeniu koncepcji pracy, optymalizacji metody TRS-PCR i interpretacji wyników badań. Mój udział procentowy szacuję na 10%.

II. Zastosowanie spektroskopii FTIR i sztucznych sieci neuronowych w analizie genetycznej i fenotypowej bakterii

3. Lechowicz L., Adamus-Białek W., Kaca W.; Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Artificial Neural Networks Applied to Differentiate Escherichia coli papG+/papG- strains., Journal of Spectroscopy, 2013, (2013), Article ID 538686, 3 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/538686>

IF: 0, MNiSzW 0

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w tworzeniu koncepcji pracy, przeprowadzeniu części eksperymentalnej (przygotowanie materiału badawczego, reakcja PCR specyficzna wobec genu papC) i interpretacji wyników badań. Mój udział procentowy szacuję na 25%.

4. Lechowicz L., Urbaniak M., Adamus-Białek W., Kaca W., The use of infrared spectroscopy and artificial neural networks for detection of uropathogenic Escherichia coli strains' susceptibility to cephalothin., Acta Biochimica Polonica, 2013, 60(4): 713-718

IF 1,389, MNiSzW 15

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w tworzeniu koncepcji pracy, przeprowadzeniu części eksperymentalnej (przygotowaniu materiału badawczego) i interpretacji wyników badań. Mój udział procentowy szacuję na 25%.

III. Analizy sanitarne wybranych środowisk

5. Adamus-Białek W.*, Karwacka K., Bak L., Microflora of the selected water reservoirs in Świętokrzyskie Voivodship, Acta Biochimica Polonica, 2013, 60(4): 689-693

IF 1,389, MNiSzW 15

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w tworzeniu koncepcji pracy, przeprowadzeniu części eksperymentalnej (zaplanowanie prac eksperymentalnych i udział w ich realizacji), interpretacji wyników badań, przygotowanie manuskryptu i korespondencji w trakcie recenzji artykułu. Mój udział procentowy szacuję na 65%.

6. Adamus-Białek W.*, Wawszczak M., Filipiak A., Woźniak A., Jasek P., Głuszek S., Sanitary state of surface waters in Świętokrzyskie voivodeship, Medical Studies, 2019, 35(1):10–15

IF 0, MNiSzW 10

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy, przeprowadzeniu części eksperymentalnej (zaplanowanie prac eksperymentalnych i udział w ich realizacji), interpretacji wyników badań, przygotowanie manuskryptu i korespondencji w trakcie recenzji artykułu. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

7. Adamus-Białek W.*, Wawszczak M., Zastosowanie sekwencji 16S rRNA w identyfikacji bakteryjnego DNA izolowanego z różnych materiałów, Rocznik Świętokrzyski seria B – nauki przyrodnicze; 2014; 35:3-14

IF 0, MNiSzW 1

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, przeprowadzeniu części eksperymentalnej (zaplanowanie prac eksperymentalnych i udział w ich realizacji), interpretacji wyników badań, udział w przygotowaniu manuskryptu i korespondencji w trakcie recenzji artykułu. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

8. Adamus-Białek W.*, Józwiak M., Wawszczak M., Mikrobiologiczne zanieczyszczenie powietrza w centralnej części Gór Świętokrzyskich, Rocznik Świętokrzyski Seria B – nauki przyrodnicze; 2014; 35:13-25;

IF 0, MNiSzW 1

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, przeprowadzeniu części eksperymentalnej (zaplanowanie prac eksperymentalnych i udział w ich realizacji), interpretacji wyników badań, udział w przygotowaniu manuskryptu i korespondencji w trakcie rcenzi artykułu. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

9. Adamus-Białek W.*, Wawszczak M., Świercz A., Impact of sewage treatment plant on local environment; Proceeding of Ecopole, 2015, 9(2):4-7

IF 0, MNiSzW 9

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, przeprowadzeniu części eksperymentalnej (zaplanowanie prac eksperymentalnych i udział w ich realizacji), interpretacji wyników badań, udział w przygotowaniu manuskryptu i korespondencji w trakcie rcenzi artykułu. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

10. Adamus-Białek W.*, Wawszczak M., Microbiological contamination of food, Ecol Chem Eng A, 2015, 22(4):509-516

IF 0, MNiSzW 11

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, przeprowadzeniu części eksperymentalnej (zaplanowanie prac eksperymentalnych i udział w ich realizacji), interpretacji wyników badań, udział w przygotowaniu manuskryptu i korespondencji w trakcie rcenzi artykułu. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

IV. Badanie wpływu kompleksów metali ciężkich na produkcję piowerdyny i piocjaniny *P. aeruginosa*

11. Gałczyńska K., Kurdziel K., Adamus-Białek W., Wąsik S., Szary K., Drabik M., Węgierek-Ciuk A., Lankoff A., Arabski M., The effects of nickel(II) complexes with imidazole derivatives on pyocyanin and pyoverdine production by *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis; Acta Biochimica Polonica, 2015, 62(4):739-745

IF: 1,187, MNiSzW 15

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przeprowadzeniu części eksperymentalnej (analiza wpływu badanych związków na szczepy *P. aeruginosa*) analizie i interpretacji wyników przeprowadzonych badań, udziale w przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 20%.*

V. Analiza genetyczna chorób metabolicznych człowieka

12. Suliga E., Kozieł D., Cieśla E., Rębak D., Wawszczak M., Adamus-Białek W., Naszydłowska E., Piechowska A., Głuszek S., Omentin rs2274907 gene polymorphism and the risk of metabolic syndrome: a preliminary report, *Medical Studies*, 2018; 34(4):267–275

IF 0, MNiSzW 10

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w zaplanowaniu i w przeprowadzeniu badań laboratoryjnych, interpretacji wyników badań. Mój udział procentowy szacuję na 10%.

Genetyką bakterii zaczęłam interesować się już w czasie studiów magisterskich na kierunku biologia Akademii Świętokrzyskiej w Kielcach. Realizując wówczas pracę magisterską pt. “Analiza mutantów transpozonowych *Proteus mirabilis* S1959 w reakcjach z surowicami anty-O3 i anty-R110” w Zakładzie Mikrobiologii miałam okazję poznać wiele technik zarówno biologii molekularnej, jak i mikrobiologii. Uzyskane w trakcie badań mutanty transpozonowe *P. mirabilis* poddawałam między innymi analizom na wzrost rozpełzły i w reakcji z surowicami anty-O3 i anty-R110 stosując test ELISA. Wiedza i umiejętności zdobyte w tym okresie zainspirowały mnie do dalszego rozwoju naukowego. Szczególnie interesujące były dla mnie mechanizmy adaptacyjne bakterii, które pozwalają im przeżyć i funkcjonować w niekorzystnych warunkach środowiska. Rozpoczęłam studia doktoranckie na Uniwersytecie Łódzkim, a badania eksperymentalne prowadziłam w Pracowni Genetyki Molekularnej IBM PAN w Łodzi pod opieką dr hab. Pawła Parniewskiego. Przebywając w środowisku wybitnych naukowców miałam szansę korzystać z ich wiedzy i znajomości technik biologii molekularnej. Wtedy zaczęłam interesować się patogennością *Escherichia coli* zakażających układ moczowy, co było pierwotnym celem mojej pracy doktorskiej. Zebrałam kolekcję 127 klinicznych szczepów *E. coli* wyizolowanych z moczu pacjentów ze zdiagnozowanym zakażeniem układu moczowego. Następnie opracowałam i przeprowadziłam analizę multiplex-PCR na obecność 6 wybranych genów kodujących specyficzne czynniki patogenności. Na podstawie danych literaturowych zostały wyselekcjonowane takie czynniki patogenności, które najlepiej korelowały z uropatogennością *E. coli*: fimbria Typu 1, Fimbria P, Fimbria S, cytotoksyczny czynnik nekrozy typu 1, hemolizyna α , bakteriocyna *usp*. Obecność badanych genów patogenności została skorelowana z lekoopornością. Wykazano istotną statystycznie zależność między występowaniem badanych genów, a wrażliwością na fluorochinolony i odwrotnie. Już wcześniej podobna korelacja czynników patogenności z lekoopornością była obserwowana u *E. coli* (Martinez-Martinez i wsp., 1999; Vila i wsp., 2002; Horcajada i wsp., 2005). Głównym osiągnięciem mojej pracy doktorskiej było opracowanie techniki genotypowania szczepów *E. coli* wykorzystującej trójnukleotydowe sekwencje powtórzone (CGG)_n. Była to nowatorska metoda dająca jak do tej pory najwyższy stopień powtarzalności uzyskiwanych wyników analiz oraz pozwalająca na bardzo szerokie różnicowanie bakterii – uwzględnia głębokie klonalne różnice genetyczne między poszczególnymi izolatami bateryjnymi. Jednak co najważniejsze, nowo opracowaną techniką możliwe było zróżnicowanie szczepów na dwie odrębne biologicznie grupy – I grupa szczepów o wysokiej patogenności (obecność badanych genów kodujących czynniki patogenności) i wrażliwości na fluorochinolony, II grupa szczepów

o niskim potencjale patogenności (brak genów kodujących czynniki patogenności) i wysokiej oporności na fluorochinolony. Wyniki tych badań opublikowane zostały w pracy **(CGG)₄-based PCR as a Novel Tool for Uropathogenic Escherichia coli Discrimination: Comparison with ERIC-PCR, Adamus-Bialek W*, Wojtasik A., Majchrzak M., Sosnowski M., Parniewski P., Journal of Clinical Microbiology, 2009, 47(12):3937-44.** Badania te wprowadziły do biologii molekularnej nową technikę genotypowania bakterii oraz pozwoliły udowodnić, że z chorobotwórczością szczepów *E. coli* związane są trójnukleotydowe sekwencje powtórzone. Można wnioskować, że niestabilność sekwencji TRS jest powiązana z mechanizmami naprawy DNA jak np. mechanizm SOS, który jest indukowany przez fluorochinolony (Soto i wsp., 2006). Uniwersalność tej metody w genotypowaniu bakterii chorobotwórczych udowodniona została w kolejnej pracy **Trinucleotide repeat sequence-based PCR as a potential approach for genotyping Mycobacterium gordonae strains, Wojtasik A., Majchrzak M., Adamus-Bialek W., Augustynowicz-Kopec E., Zwolska Z., Dziadek J., Parniewski P., Journal of Microbiological Methods, 2011, 85(1):28-32.** W tym przypadku, inna sekwencja TRS – (CAC)₄ okazała się być użyteczna w szybkiej i głębokiej analizie klonalnej trudnych w diagnostyce niegruźliczych prątków *M. gordonae*, które również mają istotne znaczenie kliniczne i epidemiologiczne. Nowo opracowana technika genotypowania TRS-PCR wykorzystująca różne trójnukleotydowe sekwencje powtórzone jest obiecującym narzędziem w badaniach epidemiologicznych. Ważą cechą tej techniki jest wysoki indeks różnicowania szczepów i ponad 90% powtarzalność uzyskiwanych profili genetycznych, co ją odróżnia od innych metod genotypowania oprartych również na sekwencjach powtarzalnych jak np. ERIC-PCR.

Poszukiwanie nowych i alternatywnych technik różnicowania drobnoustrojów opiera się przede wszystkim na ograniczeniu kosztów i skróceniu czasu przeprowadzenia analizy. Ma także na celu szybkie i proste zidentyfikowanie ważnych klinicznie drobnoustrojów lub ich właściwości. Po opracowaniu nowej techniki genotypowania bakterii opartej o sekwencje TRS zostałam zaproszona do współpracy z Zespołem Naukowym prof. dr hab. Wiesława Kacy (Kierownikiem Zakładu Mikrobiologii UJK). Zaadoptowaliśmy zaawansowaną technikę atenuowanej spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera ATR FT-IR w analizie genetycznej i fenotypowej bakterii. Do odczytania skomplikowanych widm IR bakterii w korelacji z ich właściwościami zostały opracowane tzw. sztuczne sieci neuronowe. W pracy **The use of infrared spectroscopy and artificial neural networks for detection of uropathogenic Escherichia coli strains' susceptibility to cephalothin, Lechowicz L., Urbaniak M., Adamus-Bialek W., Kaca W., Acta Biochimica Polonica, 60(4):713-718 2013** opisano po raz pierwszy zastosowanie tej techniki w analizach mikrobiologicznych. Materiałem badawczym była kolekcja uropatogennych szczepów *Escherichia coli*, którą wykorzystałam w poprzednich badaniach. Uzyskane widma IR specyficzne dla każdego szczepu zostały skorelowane z wrażliwością na cefalotynę. Zaskakujące okazało się, że otrzymane bakteryjne widma IR można dalej interpretować poszukując korelacji z innymi właściwościami bakterii. Nowatorska technika okazała się użyteczna również w genetycznym różnicowaniu badanych szczepów *E. coli*. Z dokładnością powyżej 80% wykazano

powiązanie poszczególnych widm IR z obecnością lub brakiem genu *papG* w grupie badanych szczepów bakteryjnych. Wyniki badań zostały opublikowane w pracy **Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Artificial Neural Networks Applied to Differentiate *Escherichia coli* papG+/papG- strains**, Lechowicz L. Adamus-Białek W., Kaca W., **Journal of Spectroscopy**, 2013, (2013), Article ID 538686, 3 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/538686>. Nie jest wyjaśnione na jakiej podstawie odbywa się interpretacja widm bakteryjnych. Prawdopodobnie jest to ogólny profil molekularny ale niezbędne są dalsze analizy do wyjaśnienia specyfiki komponentów chemicznych korelujących z poszczególnymi właściwościami bakterii. Szybka i prosta technika ATR FT-IR stwarza nowe możliwości diagnostyczne ale dalsze badania są niezbędne do stworzenia referencyjnego banku danych i narzędzi do rutynowej interpretacji uzyskiwanych widm bakteryjnych.

W obrębie prowadzonych przeze mnie badań mikrobiologicznych, interakcje bakterii ze środowiskiem oraz czynniki, które mogą wpływać na ich występowanie były dla mnie kolejną inspiracją do rozwoju naukowego. Wieloletnia praca w Katedrze Ochrony i Kształtowania Środowiska Wydziału Matematyczno – Przyrodniczego UJK przyczyniła się do poszerzenia swoich zainteresowań naukowych o aspekt epidemiologiczny w badaniach środowiskowych. Prowadziłam szereg analiz o zasięgu lokalnym, które uwzględniały występowanie bakterii w różnych środowiskach t. j. zbiorniki wodne, osady denne, powietrze, produkty spożywcze, oczyszczalnie ścieków. Jednym z ważnych problemów środowiskowych jest nieodpowiednia jakość wód powierzchniowych na świecie, na którą największy wpływ mają czynniki ekonomiczne i środowiskowe danego terytorium (Mazari-Hiriart i wsp., 2008; Hlavsa i wsp. 2011). Wiele organizacji, zarówno na całym świecie oraz w Polsce angażują się w ochronę i kontrolę zasobów wodnych. Mimo to, przy obecnych tendencjach, więcej niż pół miliarda ludzi nie ma dostępu do odpowiedniej jakości wody. Każdego roku zanieczyszczona woda w połączeniu z brakiem dostępu do podstawowych warunków sanitarnych przyczynia się do śmierci co najmniej 1,6 miliona dzieci w wieku poniżej pięciu lat (Joint Monitoring Programme for Water Supply and Sanitation, 2006). Polska jest wśród krajów o niewystarczających zasobach wodnych, które charakteryzują się znacznym zanieczyszczeniem, zmiennością sezonową i nierównym rozkładem terytorialnym (Główny Urząd Statystyczny, 2013). Podstawowym i często jedynym badaniem wykonywanym w stacjach sanitarno – epidemiologicznych jest ocena występowania drobnoustrojów kałowych, głównie *Escherichia coli* i *Enterococcus* sp. (Toranzos i McFeters, 1998; Bartram & Rees, 2000; Jones i wsp., 2002; Pickup i wsp., 2003). Niestety, występuje wysokie ryzyko występowania wielu innych niebezpiecznych patogennych gatunków bakterii jak na przykład patogenne szczepy *E. coli* (VTEC, EHEC), *Salmonella* spp., *Shigella* sp., *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae* (Mazari-Hiriart i wsp., 2001, Le Dantec et al., 2002; Smylla i wsp., 2003; Hlavsa i wsp., 2011; ECDC, 2012, Jones i wsp., 2002; ECDC, 2012). Mając na względzie powyższe, we współpracy z dr Łukaszem Bąkiem z Politechniki Świętokrzyskiej podjęliśmy się szczegółowej analizy wybranych zbiorników wodnych województwa świętokrzyskiego. Moje badania obejmowały analizę obecności wskaźników mikrobiologicznych (ogólna liczba bakterii mezofilnych i psychrofilnych, bakterie grupy *coli*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* sp., *Enterococcus*

faecalis, *Clostridium perfringens*) w wodzie i osadzie dennym danego zbiornika, a wyniki opublikowano w **Microflora of the selected water reservoirs in Swietokrzyskie Voivodship**, **Adamus-Bialek W.***, **Karwacka K.**, **Bak L.**, **Acta Biochimica Polonica**, **2013**, **60(4):689-693**. Zaobserwowano duże zróżnicowanie w ogólnej liczbie bakterii i brak korelacji z innymi parametrami badanych zbiorników, czy warunków środowiska. W każdym zbiorniku w wodzie i osadzie dennym wykazano obecność wszystkich badanych bakterii (zimną i/lub wiosną), w niektórych przypadkach wartości przekraczały 50 cfu/ml w wodzie lub 50 cfu/g w osadzie dennym. Obecność bakterii *Shigella* sp. i *Salmonella* spp. została potwierdzona prawie we wszystkich badanych zbiornikach wodnych. Należy podkreślić, że wartości te uzyskiwane były dla prób wody pobieranych również w okresie zimy, można więc spodziewać się, że przy wzroście temperatury, szczególnie latem, liczebność bakterii będzie wzrastać. Co więcej, wyniki wskazują, że osad denny może stanowić pewnego rodzaju rezerwuuar groźnych patogenów. Szczególnie niepokojący jest fakt, że w okresie lata zbiorniki te pełnią funkcje rekreacyjne, ale gminy nie są zobowiązane do ich analizy sanitarnej, ponieważ nie spełniają wymogów infrastrukturalnych, które by je klasyfikowały jako zbiorniki rekreacyjne według standardów UE. Podobne wyniki badań uzyskaliśmy w kolejnych analizach opublikowanych w pracy **Sanitary state of surface waters in Świętokrzyskie voivodeship**, **Adamus-Bialek W.***, **Wawszczak M.**, **Filipiak A.**, **Woźniak A.**, **Jasek P.**, **Głuszek S.**, **Medical Studies**, **2019**, **35(1): 10-15**. Miejsca badawcze obejmowały kolejne trzy rzeki i dwa zbiorniki wodne w województwie świętokrzyskim. Próbkę wody były badane pod względem występowania bakterii grupy coli, *E. coli*, bakterii mezofilnych i psychrofilnych. Obecność *E. coli* została potwierdzona we wszystkich analizowanych wodach powierzchniowych, jednak przekroczenie dopuszczalnych norm sanitarnych dotyczyło rzeki Wisły and jeziora Szmaragdowego. Obecne w wodzie patogeny mogą infekować ludzi, którzy następnie mogą stać się nosicielami np. salmonellozy, stanowiąc groźne ogniwo epidemiologiczne. Nadal dane epidemiologiczne podają częste występowanie salmonelloz i shigelloz w wielu krajach Europy. Przeprowadzone badania własne stanowią kolejny dowód na to, że środowisko jest doskonałym rezerwuarem patogennych bakterii, a społeczność powinna być bardziej świadoma zagrożeń i możliwości ochrony przed groźnymi patogenami pochodzenia środowiskowego.

Innym materiałem, który został poddany analizie były teflonowe wkładki filtracyjne asymilujące powietrze z wysokości 30 m n.p.g. w Stacji Bazowej ZMŚP Święty Krzyż w Świętokrzyskim Parku Narodowym oraz próbki osadu czynnego (suchego i mokrego). Wyniki badań opublikowano w pracy **Zastosowanie sekwencji 16S rRNA w identyfikacji bakteryjnego DNA izolowanego z różnych materiałów**, **Adamus-Bialek W.***, **Wawszczak M.**, **Rocznik Świętokrzyski seria B – nauki przyrodnicze**, **2014**, **35:3-14**. Przeprowadzono izolację całkowitego DNA, które poddano analizie metodą PCR wykrywającą sekwencje 16S rRNA specyficzne dla bakterii należących do *Archaea* lub *Eubacteria* (Macrae, 2000). Uzyskano potwierdzenie obecności bakterii należących tylko do *Eubacteria*. Brak DNA specyficznego dla *Archaea* mógł wynikać z niedostosowania techniki izolacji DNA, ze względu na złożoność ściany komórkowej bakterii należących do tej domeny taksonomicznej. Można wnioskować, że zarówno filtry stosowane do analizy pyłu powietrza jak i osad czynny to dobre materiały

do dalszych analiz metagenomowych i poszukiwania drobnoustrojów o unikalnych właściwościach. Dalsze badania skupiały się na analizie fenotypowej wyizolowanych z filtrów bakterii metodami fenotypowymi. Drobnoustroje inkubowano w różnych warunkach wzrostu i na różnych podłożach, a następnie przeprowadzano podstawowe techniki identyfikacji drobnoustrojów na podstawie obserwacji makroskopowej, mikroskopowej i wymagań żywieniowych. Zróżnicowane warunki hodowli pozwoliły wyizolować szczepy odmienne pod względem makroskopowym. Wybrane kolonie bakteryjne posłużyły do przygotowania barwionych preparatów mikroskopowych metodą Grama. Ponadto dokonano analizy właściwości biochemicznych wyizolowanych drobnoustrojów. Wyniki analiz opublikowano w pracy **Mikrobiologiczne zanieczyszczenie powietrza w centralnej części Gór Świętokrzyskich, Adamus-Białek W.*, Jóźwiak M., Wawszczak M., Rocznik Świętokrzyski Seria B – nauki przyrodnicze, 2014, 35:13-25.** Na podstawie makroskopowej oceny pojedynczych kolonii zaobserwowano duży poziom zróżnicowania szczepów, mimo powtarzających się form komórkowych, widocznych w obrazie mikroskopowym. W większości przeważały bakterie heterotroficzne mezofilne. Prezentowane wyniki przedstawiają potencjał wykorzystania filtrów powietrza do poszukiwania drobnoustrojów o charakterystycznych właściwościach adaptacyjnych. Źródłem analizowanego pyłu przenoszonego przez ruchy powietrza mogą być elektrownie, zakłady przemysłowe, ciepłownie, komunikacja i gospodarstwa domowe. Istotny wpływ na stan powietrza atmosferycznego w regionie świętokrzyskim mają także odległe ośrodki miejsko – przemysłowe (Górnośląski Okręg Przemysłowy GOP, region Morawskiej Ostrawy w Czechach). Miejsca te stwarzają specyficzne warunki, często o skrajnych parametrach, co determinuje występowanie drobnoustrojów o unikalnych właściwościach metabolicznych. Prezentowana praca ma charakter nowatorski, ponieważ nigdy z badanego terenu nie były pobierane próbki filtra do badań mikrobiologicznych. Czynnikiem specyficznym jest również wysokość – 30 m od gruntu ponad koronami drzew (595 m n.p.m.) z jakiej absorbowano pył powietrza na filtr badawczy. Należy jednak podkreślić, że praca przedstawia bardzo ogólne i podstawowe wyniki analiz, które mogą być ciekawym wstępem do dalszych badań w przyszłości.

Kontynuując badania epidemiologiczne podjęłam współpracę ze stacjami sanitarno-epidemiologicznymi na terenie województwa świętokrzyskiego. Pozyskane dane na temat dystrybucji i zanieczyszczenia osadów ściekowych i wzbogacone przez nasze analizy powietrza w okolicy oczyszczalni ścieków dały wiele ciekawych obserwacji i wniosków. Wyniki badań opublikowano w pracy **Impact of sewage treatment plant on local environment, Adamus-Białek W.*, Wawszczak M., Świercz A., Proceeding of Ecopole, 2015, 9(2):4-7.** Celem badań była analiza trzech oczyszczalni ścieków (w Busku-Zdroju, Kazimierzy Wielkiej i Pińczowie, w województwie świętokrzyskim) pod względem stanu sanitarnego osadów ściekowych (występowanie *Salmonella* spp. oraz jaj pasożytów jelitowych) i ich zagospodarowania. Jakość mikrobiologiczna osadów ściekowych, składu mineralnego i materii organicznej gleby (humus) była wystarczająca aby wykorzystać je jako nawozy naturalne, ale nie do uprawy roślin przeznaczonych do spożycia przez ludzi ze względu na obecność *Salmonella* spp. i/lub jaj pasożytów chorobotwórczych. Z danych udostępnionych przez SANEPID złoża te były szeroko

wykorzystywane jako materiał do rekultywacji terenu w Pińczowie. Wykorzystanie osadów jako nawozów organiczno-mineralnych powinno być ostrożne, ze względu na potencjalne źródło drobnoustrojów chorobotwórczych (Andres, 1999; Sahlström i wsp., 2004). Świadczą o tym zarejestrowane ogniska epidemii spowodowanych skażeniem gleb w Polsce i Europie po stosowaniu osadów ściekowych (Kłapeć i Cholewa, 2012). Niemniej jednak, wykorzystanie osadów ściekowych może być przydatne w rekultywacji terenów „jałowych” oraz jako naturalny nawóz do gleby, ale po dokładnym zbadaniu (Dumontet i wsp., 2011; Kłapeć i Cholewa, 2012; Niazi i wsp., 2015). Dalszym celem badań było określenie czystości mikrobiologicznej powietrza w pobliżu dwóch oczyszczalni ścieków (w Strykowie i Szczecnie, w województwie świętokrzyskim) na podstawie ogólnej liczby bakterii mezofilnych i psychrofilnych oraz *Staphylococcus* sp.. Wykazano, że całkowita liczba bakterii izolowanych z powietrza z każdego miejsca była akceptowalna. Nie było związku między liczbą mikroorganizmów w powietrzu, a odległością od poszczególnych oczyszczalni ścieków, co więcej wyniki wskazały nawet na większą liczbę bakterii w dalszej odległości od oczyszczalni ścieków. Wiadomo, że liczba bakterii w powietrzu może zależeć od kierunku wiatru, temperatury i intensywności działania w oczyszczalniach ścieków (Filipkowska i wsp., 2000; Niazi i wsp., 2015). Liczba wykrytych bakterii wydaje się być mniejsza w porównaniu z badaniami przeprowadzonymi w innych oczyszczalniach ścieków (Cyprowski i Krajewski, 2003; Okoch i wsp., 2007; Breza-Boruta, 2010; Budzińska i wsp., 2011; Niazi i wsp., 2015). Różnice te mogą wynikać z innej wielkości obiektu i ilości ścieków wpływających do oczyszczalni. Budzińska i wsp. (2011) podczas badania oczyszczalni ścieków zidentyfikowali również dużą liczbę *Pseudomonas fluorescens*, które należą do bakterii naturalnie żyjących w silnie zanieczyszczonych wodach powierzchniowych i ściekach (Salyers i Whitt, 2005). W naszym badaniu analizowaliśmy obecność całkowitej liczby bakterii i mannitolo-dodatnich *Staphylococcus* spp.. Te wskaźniki wydają się bardziej istotne epidemiologicznie, ze względu na potencjalne ryzyko występowania również bakterii chorobotwórczych dla człowieka. Warto zauważyć, że oczyszczalnie ścieków mogą również wpływać na stan sanitarny lokalnych rzek. Ponadto, literatura wskazuje, że wraz z rozprzestrzenianiem się bakterii z oczyszczalni ścieków, wzrasta ryzyko występowania w środowisku genów oporności na antybiotyki, co może wpływać na wzrost lekooporności wśród drobnoustrojów środowiskowych i naturalnych komensali jelitowych (Huang i wsp., 2012; Li i wsp., 2015). Podsumowując, badania własne jak i innych autoów wskazują, że wykorzystanie osadów ściekowych do rekultywacji terenów jest pomocne w zachowaniu i przywróceniu równowagi ekologicznej składników mineralnych, która jest ważnym aspektem ochrony gospodarczej i środowiska. Należy jednak pamiętać, że oczyszczalnie ścieków jak i ich osady ściekowe mogą mieć wpływ na zanieczyszczenie powietrza i gleby stwarzając niebezpieczeństwo dla zdrowia publicznego. Wydaje się, że mikrobiologiczny monitoring środowiska powinien być częściej przeprowadzany i w szerszym zakresie.

Dalsza współpraca ze stacjami SANEPID dostarczyła również ważnych obserwacji na temat zanieczyszczeń mikrobiologicznych produktów spożywczych. Wyniki pozyskanych badań mikrobiologicznych produktów spożywczych w latach 2008 – 2011 zostały umieszczone w pracy

Microbiological contamination of food, Adamus-Białek W.*, Wawszczak M., Ecol Chem Eng A, 2015, 22(4):509-516. Analizowano różne rodzaje produktów spożywczych (mięso, produkty mleczne, zboża produkty, ryby, warzywa, owoce, woda, napoje bezalkoholowe, tłuszcze roślinne, zioła, kawa, herbata, kakao, artykuły spożywcze przeznaczone do szczególnych zastosowań żywieniowych i suplementów diety) pochodzenia krajowego i żywności importowanej. Określano obecność *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*. Bakterie *Escherichia coli* i *Yersinia enterocolitica* wykrywano najrzadziej, a najczęściej wykrywano *Salmonella* spp., która jest również odpowiedzialna za największą liczbę zatruc pokarmowych w Polsce. *Salmonella* spp. wykrywano głównie w produktach krajowych takich jak drób, jaja i produkty jajeczne, zboże i produkty zbożowe, kawa, kakao, herbata, produktów garmazeryjne i suplementy diety. Ponadto, wszystkie wyroby cukiernicze dały pozytywny wynik na obecność *Salmonella* spp. W kolejnych latach obserwowano wzrost częstości występowania tych bakterii. Obecność *Listeria monocytogenes* najczęściej obserwowano w wyrobach cukierniczych, daniach gotowych, mleku i produktach mlecznych, najrzadziej w owocach i warzywach. Należy podkreślić, że wszystkie analizowane próbki zawierały co najmniej jeden z badanych gatunków. Znane są typowe źródła występowania poszczególnych gatunków bakterii (Muskalska i Szymczak, 2015; Padungtod, 2006; Williams i wsp., 2015) ale tak powszechna obecność *E. coli*, *Y. enterocolitica*, *L. monocytogenes* i przede wszystkim *Salmonella* spp. wykryta w produktach spożywczych jest dość zaskakująca. *E. coli* była nawet wykrywana w butelkowanej wodzie mineralnej i innych napojach. Przykładowo, wykryte bakterie w wodzie wodociągowej dyskwalifikują ją jako zdatną do spożycia i korzystania w gospodarstwach domowych. Należy pamiętać, że zanieczyszczenie żywności może także spowodować wzrost przypadków zatruc pokarmowych, a także innych chorób wywoływanych przez te chorobotwórcze bakterie. Ważne jest, aby przestrzegać zasad higieny podczas produkcji, przygotowania i konsumpcji produktów spożywczych. Warto jednak podkreślić, że obecność patogennych bakterii w żywności nie zawsze musi się wiązać z powstaniem choroby po ich spożyciu. Istotna jest również dawka zakaźna drobnoustroju. Ponadto, każdy organizm ma mechanizmy obronne, które zapobiegają infekcjom bakteryjnym. Zdolność do obrony jest indywidualną cechą osobniczą i determinuje występowanie choroby (Ferlazzo i wsp., 2002; Wardemann i wsp., 2002; Dempsey i wsp., 2003; Kopp i Medzhitov, 2003; Sochocka i Błach-Olszewska, 2005). Ważne jest jednak aby społeczeństwo było świadome zagrożeń i sposobów prewencji rozprzestrzeniania chorób zakaźnych. Zgadnienia te powinny być częściej publikowane do wiadomości publicznej. Podsumowując wyniki analiz sanitarnych różnych środowisk należy podkreślić, że w pełni wpisują się one w priorytetowe działania z zakresu promocji zdrowia Narodowego Programu Zdrowia mające na celu zmniejszenie narażenia na czynniki szkodliwe w środowisku życia i pracy oraz poprawę stanu sanitarnego kraju.

Zakres prowadzonych przeze mnie badań dotyczył również analizy czynników wpływających na bakteryjną patogenność. Oprócz analizy patogenności *Escherichia coli*, która stanowiła moje osiągnięcie naukowe, brałam również udział w badaniach nad patogennością *Pseudomonas aeruginosa*, dzięki współpracy z dr hab. Michałem Arabskim, będącym wówczas w Zespole profesora Wiesława Kacy.

Celem prowadzonych eksperymentów było określenie wpływu wybranych kompleksów metali ciężkich na produkcję piocyjaniny i piowerdyny oraz tworzenie biofilmu klinicznych szczepów *Pseudomonas aeruginosa*. Wyniki tych badań zostały opublikowane w pracy **The effects of nickel(II) complexes with imidazole derivatives on pyocyanin and pyoverdine production by *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis**, Gałczyńska K., Kurdziel K., Adamus-Białek W., Wąsik S., Szary K., Drabik M., Węgierek-Ciuk A., Lankoff A., Arabski M., *Acta Biochimica Polonica*, 2015, 62(4):739-745. Zakażenia wywołane przez *Pseudomonas aeruginosa* są uporczywe i trudne w leczeniu, szczególnie w przypadku pacjentów chorujących na mukowiscydozę. Mukowiscydoza jest dziedziczną chorobą, charakteryzującą się przewlekłym zapaleniem dróg oddechowych, prowadzącą do niewydolności oddechowej. Powoduje akumulację śluzu w płucach, który zwiększa podatność pacjenta na infekcje bakteryjne, które doprowadzają do postępującego uszkodzenia płuc i rozedmy. Gromadzony śluz w płucach stanowi doskonałe środowisko do tworzenia biofilmu bakteryjnego, który upośledza bakteriobójcze działanie antybiotyku i stwarza poważne problemy terapeutyczne (Stewart i Costerton, 2003; Manago i wsp., 2015). *P. aeruginosa* jest typowym czynnikiem etiologicznym infekcji układu oddechowego u pacjentów z mukowiscydozą. Do jego charakterystycznych właściwości należy zdolność do wytwarzania piocyjaniny i piowerdyny (Kolpen i wsp., 2014; Nguyen i wsp., 2014; Muller i Merrett, 2015). Piocyjanina jest barwnym związkiem posiadającym umiejętność przyjmowania i oddawania elektronów. Jest w stanie uszkodzić rzęski nabłonka oddechowego, zwiększa wydzielanie IL-8 przez komórki nabłonkowe, indukuje apoptozę i hamuje proliferację limfocytów T (Gloyne i wsp., 2011). Piowerdyna działa jako siderofor, wiąże i przenosi jony żelaza do komórki bakteryjnej. Udowodniono także, że odgrywa kluczową rolę w tworzeniu się biofilmu, niezależnie od obecności żelaza (Meyer i wsp., 1996; Jimenez i wsp., 2010). Celem przeprowadzonych badań była analiza wpływu NiCl_2 , nowosyntetyzowanych dwóch kompleksów niklu (II) ($[\text{Ni}(1\text{-allim})_6](\text{NO}_3)_2$, $[\text{Ni}(\text{iaa})_2(\text{H}_2\text{O})_2] \times \text{H}_2\text{O}$) oraz ich samych ligandów w stężeniach 7 – 500 μM na produkcję piocyjaniny i piowerdyny przez 23 kliniczne szczepy *P. aeruginosa* wyizolowane od pacjentów z mukowiscydozą. Zastosowane stężenia związków były nietoksyczne dla komórek eukariotycznych linii A549. Nie zaobserwowano zmniejszenia produkcji piocyjaniny ani piowerdyny w przypadku żadnego badanego szczepu pod wpływem $[\text{Ni}(\text{iaa})_2(\text{H}_2\text{O})_2] \times \text{H}_2\text{O}$, $[\text{Ni}(1\text{-allim})_6](\text{NO}_3)_2$, NiCl_2 oraz zastosowane ligandy (imidazole-4-acetate anion i 1-allylimidazole) zmniejszyły produkcję piowerdyny w 40% testowanych szczepów *P. aeruginosa*. Podobne badania innych autorów przedstawiają bakteriobójcze działanie związków z podobnymi pochodnymi imidazolu zastosowanych w dużo wyższych stężeniach (De-sai i wsp., 2013; Vijesh i wsp., 2011). Właściwości przeciwbakteryjne pochodnych imidazolu były określone, na przykład, dla 1-alkiloimidazolu (Khabnadideh i wsp., 2003), 2-(fenylo)-1H-imidazolu i innych (Sharma i wsp., 2009; Khalafi-Nezhad i wsp., 2005; Khan i wsp., 2008). Anion 4-octanu imidazolu i 1-alliloimidazol wykazały dobre właściwości dyfuzyjne przez dojrzały biofilm szczepu *P. aeruginosa* PAO1, mierzony za pomocą interferometrii laserowej i konfokalnej mikroskopii. Wartość współczynnika dyfuzji imidazolu-4-octanu w biofilmie była dwukrotnie wyższa niż w przypadku 1-alliloimidazolu. Wartości te są zbliżone do

współczynnika dysuzji ciprofloksacyny (Arabski i wsp., 2013) stosowanej w leczeniu zakażeń u pacjentów z mukowiscydozą. W związku z tym mogą być rozważane w syntezie chemicznej z innymi metalami, na przykład z takimi, które działają jak antagoniści żelaza np. kobalt lub gal. Uzyskane wyniki analiz są przykładem badań nad alternatywnymi rozwiązaniami dla antybiotyków lub jako czynniki wzmacniające antybiotykoterapię infekcji lekoopornych.

Biorąc pod uwagę swoje dotychczasowe osiągnięcia i zainteresowania naukowe, podjęłam decyzję o przeniesieniu swojego zatrudnienia na Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu tej samej uczelni. Zakres moich dotychczasowych badań obejmował obszar mikrobiologii klinicznej i sanitarnej, uznałam więc, że praca w na Wydziale Lekarskim i Nauk o Zdrowiu będzie bardziej kompatybilna z moimi zainteresowaniami naukowymi oraz wzbogaci mój dalszy rozwój naukowy w kierunku ochrony zdrowia i analizy problemów zdrowotnych u ludzi. Po rocznej pracy w Zakładzie Mikrobiologii Instytutu Nauk Medycznych zostałam kierownikiem Pracowni Genetyki w Zakładzie Chirurgii i Pielęgniarstwa Chirurgicznego pod opieką prof. dr hab. n. med. Stanisława Głuszka. Jednocześnie objęłam opiekę nad materiałem klinicznym (krew, tkanka) pobranym od ponad 1000 pacjentów i zostałam włączona do badań nad uwarunkowaniami genetycznymi chorób trzustki i zespołu metabolicznego. Praca w nowym zespole otworzyła kolejne możliwości współpracy naukowej, co zaowocowało udziałem w publikacji: **Suliga E., Koziel D., Cieśla E., Rębak D., Wawszczak M., Adamus-Białek W., Naszydłowska E., Piechowska A., Głuszek S., Omentin rs2274907 gene polymorphism and the risk of metabolic syndrome: a preliminary report, Medical Studies, 2018, 34(4):267–275.** W pracy, 108 osób z rozpoznaniem zespołu metabolicznego oraz od 111 osób reprezentujących grupę kontrolną zostało włączonych do badań – przeprowadzono badania kliniczne oraz analizę polimorfizmu rs2274907 genu omentyny-1 metodą PCR-RFLP. Praca przedstawia po raz pierwszy badanie potencjalnej zależności między polimorfizmem rs2274907 genu omentyny, a ryzykiem wystąpienia zespołu metabolicznego. Zespół metaboliczny to kumulacja czynników ryzyka, takich jak: otyłość brzuszna, dyslipidemia, nieprawidłowy poziom glukozy we krwi i podwyższone ciśnienie krwi (Alberti i wsp., 2009; Rębak i wsp., 2015). W literaturze wielokrotnie przedstawiano korelację pomiędzy stężeniem omentyny, a występowaniem pewnych parametrów biochemicznych lub czynników ryzyka zespołu metabolicznego (Auguet i wsp., 2011; Herder i wsp., 2017), wyniki badań są jednak niejednoznaczne. Prawdopodobnie dlatego, że na wystąpienie zespołu metabolicznego wpływa wiele czynników genetycznych i środowiskowych i ich interakcji między sobą. Wyniki naszych analiz nie wykazały żadnej istotnej zależności pomiędzy polimorfizmem Val109Asp genu omentyny-1, a ryzykiem zespołu metabolicznego, ani jego komponentami. Zaobserwowaliśmy jedynie tendencję do częstszego występowania genotypu Val/Asp u osób z zespołem metabolicznym w porównaniu do grupy kontrolnej i częstszym występowaniem genotypu Asp/Asp w grupie kontrolnej w porównaniu z osobami z zespołem metabolicznym. Badania nad ekspresją i polimorfizmem genów omentynowych w odniesieniu do metabolicznych czynników ryzyka są jednymi z nielicznych. Na podstawie naszych analiz można wnioskować tylko potencjalny pośredni wpływ czynników genetycznych i ich znaczenie również dla innych chorób takich jak otyłość, cukrzyca typu 2,

niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby (NAFLD) i tętnica wieńcowa, dla których zespół metaboliczny jest czynnikiem ryzyka. Należy przeprowadzić dalsze analizy na większej grupie badanych. Niewątpliwie poszukiwanie genetycznych powiązań z chorobami metabolicznymi jest bardzo obiecującym kierunkiem w prewencji chorób cywilizacyjnych.

5.2. Analiza bibliometryczna

I. Oryginalne pełnotekstowe prace naukowe (bez streszczeń zjazdowych i konferencyjnych, prac w suplementach czasopism, listów do redakcji oraz udziału autora wymienionego w dodatku (appendix) jako uczestnika badań wielośrodkowych, recenzji):

A. W czasopismach z Impact Factor:

Rok	Tytuł czasopisma	Liczba prac	IF	Punkty MNiSW
2009	Journal of Clinical Microbiology	1	4.162	24
2011	Journal of Microbiological Methods	1	2.086	25
2013	Acta Biochimica Polonica	2	2.778	30
2013	Molecular Biology Reports	1	1.958	20
2015	Acta Biochimica Polonica	2	2.374	30
2017	Molecular Biology Reports	1	1.889	15
2018	Molecular Biology Reports	1	1.889	15
2019	Microbial Pathogenesis	1	2.332	20
2019	Virulence	1	3.947	35
Łącznie:		11	23.415	214

B. W czasopismach bez Impact Factor:

Rok	Tytuł czasopisma	Liczba prac	Punkty MNiSW
2013	Journal of Spectroscopy	1	0
2014	Rocznik Świętokrzyski seria B – nauki przyrodnicze	2	2
2015	Ecological Chemistry and Engineering. A	1	11
2015	Proceeding of Ecopole	1	9
2018	Studia Medyczne/Medical Studies	1	10
2019	Studia Medyczne/Medical Studies	1	10
Łącznie:		7	42

Opisy przypadków:

A. W czasopismach z Impact Factor: 0

B. W czasopismach bez Impact Factor: 0

Prace przeglądowe:

A. W czasopismach z Impact Factor: 0

B. W czasopismach bez Impact Factor: 0

II. Publikacje książkowe (autorstwo lub współautorstwo):

A. W języku obcym: liczba: 0

B. W języku polskim: liczba: 0

III. Rozdziały w wydawnictwach zwartych:

A. W języku obcym: liczba: 0

B. W języku polskim: liczba: 0

IV. Rozdział w wydawnictwie pokonferencyjnym: liczba: 1, MNiSW: 5

V. Redaktor naczelny czasopisma o zasięgu:

A. Międzynarodowym: liczba: 0

B. Krajowym: liczba: 0

VI. Redaktor naczelny wieloautorskiej publikacji książkowej:

A. W języku obcym: liczba: 0

B. W języku polskim: liczba: 0

Informacje dodatkowe:

VII. Liczba streszczeń zjazdowych/konferencyjnych: 28

VIII. Prace popularno-naukowe i inne: 0

IX. Liczba publikacji w suplementach czasopism: 0

X. Liczba publikacji z udziałem autora w badaniach wielośrodkowych: 0

Łączna liczba publikacji:	40
Łączna punktacja Impact Factor:	23.415
Łączna punktacja MNiSW:	261
Liczba cytowań (Web of Science Core Collection):	
Sumaryczna liczba cytowań:	69
Liczba cytowań bez autocytaowań:	55
indeks Hirscha:	4

5.3. Kierowanie międzynarodowymi i krajowymi projektami badawczymi oraz udział w takich projektach

W przebiegu swojej pracy naukowej brałam udział w pięciu projektach naukowych. Jeden z nich realizowałam jako grant promotorski w trakcie pracy doktorskiej. Po doktoracie brałam czynny udział w pozostałych projektach, będąc kierownikiem projektu lub wykonawcą. Najważniejsze dla mojego dorobku naukowego były – **grant promotorski nr N404 097 032/3354 (panel nauk o zdrowiu)** finansowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz **projekt Sonata nr 2011/01/D/NZ7/00107 (panel nauk o zdrowiu)** finansowany przez Narodowe Centrum Nauki.

W projekcie N404 097 032/3354 pt. “Opracowanie molekularnej metody diagnostyki i różnicowania uropatogennych szczepów *Escherichia coli* w oparciu o technikę multiplex-PCR i TRS-PCR” byłam głównym wykonawcą, a uzyskane wyniki badań były podstawą do przygotowania rozprawy doktorskiej. Projekt był finansowany w wysokości 54 600 zł. Wyniki badań zostały opublikowane w pracy Adamus-Białek W.*, Wojtasik A., Majchrzak M., Sosnowski M., Parniewski P., (CGG)4-based PCR as a Novel Tool for Uropathogenic *Escherichia coli* Discrimination: Comparison with ERIC-PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, 47(12):3937-44 (IF: 4,162; MNiSzW 35) i prezentowane na 4 konferencjach krajowych i zagranicznych.

W projekcie 2011/01/D/NZ7/00107 pt. “Analiza epidemiologiczna uropatogennych szczepów *Escherichia coli*” byłam kierownikiem i jednocześnie głównym wykonawcą. Projekt był finansowany w wysokości 196 115,00 zł. Uzyskane wyniki badań były prezentowane na licznych konferencjach krajowych i międzynarodowych oraz opublikowane w 8 oryginalnych pracach w czasopismach z listy JCR o łącznej liczbie Impact Factor 15,602. Większość z wymienionych prac powstałych w trakcie realizacji projektu, była podstawą mojego osiągnięcia naukowego w postępowaniu habilitacyjnym:

- Adamus-Białek W*, Zajac E, Parniewski P, Kaca W, Comparison of antibiotic resistance patterns in collections of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* uropathogenic strains. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(4):3429-35 (IF: 1,958)
- Lechowicz L., Adamus-Białek W., Kaca W.; Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Artificial Neural Networks Applied to Differentiate *Escherichia coli* papG⁺/papG⁻ strains. *Journal of Spectroscopy*, 2013, (2013), Article ID 538686, 3 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/538686>
- Adamus-Białek W*, Kubiak A, Czerwonka G, Analysis of uropathogenic *Escherichia coli* biofilm formation under different growth conditions. *Acta Biochim Pol*, 2015, 62(4): 765-71 (IF: 1,187)
- Czerwonka G, Guzy A, Kałuża K, Grosicka M, Dańczuk M, Lechowicz Ł, Gmitter D, Kowalczyk P, Kaca W, The role of *Proteus mirabilis* cell wall features in biofilm formation, *Arch Microbiol*. 2016, 198(9):877-84. (IF 1,607)
- Adamus-Białek W*, Lechowicz Ł., Kubiak-Szeligowska AB, Wawszczak M, Kamińska E, Chrapek M, A new look at the drug-resistance investigation of uropathogenic *E. coli* strains. *Mol Biol Rep*, 2017, 44(1):191-202 (IF: 1,889)
- Adamus-Białek W*, Baraniak A, Wawszczak M, Głuszek S, Gad B, Wróbel K, Bator P, Majchrzak M, Parniewski P, The genetic background of antibiotic resistance among clinical uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Mol Biol Rep*, 2018, pp 1-11 (IF: 1,889)

- Adamus-Białek W*, Vollmerhausen TL, Janik K, Hydrogen peroxide stimulates uropathogenic Escherichia coli strains to cellulose production. Microb Pathog, 2019, 126:287-291 (IF 2,332)
- Adamus-Białek W*, Wawszczak M, Arabski M, Majchrzak M, Gulba M, Jarych D, Parniewski P, Głuszek S, Ciprofloxacin, amoxicillin, and aminoglycosides stimulate genetic and phenotypic changes in uropathogenic Escherichia coli strains, Virulence, 2019, 10(1): 260-276 (IF: 3,947)

Wykaz projektów w których brałam udział wymieniono w tabeli poniżej:

Tytuł projektu	Nr projektu, okres realizacji, nazwa organu przyznającego fundusze na realizację projektu	Charakter udziału habilitanta w projekcie
Opracowanie molekularnej metody diagnostyki i różnicowania uropatogennych szczepów Escherichia coli w oparciu o technikę multiplex-PCR i TRS-PCR	N404 097 032/3354 , 2007 – 2008, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego	główny wykonawca – grant promotorski
Modyfikacja aktywności ureolitycznej i formowania biofilmów w środowisku, przez szczepy Proteus mirabilis w obecności substancji sygnałowych	NN 304044639 , 2011 – 2013, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego	Wykonawca
Analiza epidemiologiczna uropatogennych szczepów Escherichia coli	2011/01/D/NZ7/00107 , 2011 – 2015, Narodowe Centrum Nauki	Kierownik projektu
Znaczenie biofilmu bakteryjnego w środowisku. Próba określenia zdolności bakterii do tworzenia biofilmu metodą kolorymetryczną	496/W/10 , 2009 – 2010, Projekt badań statutowych UJK – Młoda Kadra	Kierownik projektu
Analiza zdolności szczepów Escherichia coli, izolowanych z różnych środowisk, do tworzenia biofilmów bakteryjnych, metodami genetycznymi i fenotypowymi	046/R/11 , 2011 – 2013, Projekt badań statutowych UJK – Młoda Kadra	Kierownik projektu

6. Dorobek dydaktyczny i popularyzatorski oraz informacja o współpracy międzynarodowej habilitanta

6.1. Uczestnictwo w programach europejskich oraz innych programach międzynarodowych i krajowych

Brałam udział w następujących programach dydaktyczno – naukowych:

1. „PROGRES – Program rozwoju: Gospodarka-Edukacja-Sukces” (POKL.04.01.01-00-077/10)

Program realizowany był przez Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, Priorytet IV Szkolnictwo wyższe i nauka, Poddziałanie 4.1.1 Wzmocnienie potencjału dydaktycznego uczelni. W okresie sierpień – grudzień w 2012 roku odbyłam staż naukowo – dydaktyczny w Karolinska Institute: Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology (MTC) Sztokholm w Szwecji.

2. Grant PROGRES II

Program realizowany był przez Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach. Jako opiekun studentów 23 – 28 września 2013 roku brałam udział w wyjeździe naukowym studentów II roku biotechnologii objętych programem. Podczas wyjazdu zapoznaliśmy się z infrastrukturą i działalnością naukowo – dydaktyczną Department of Chemistry, Department of Applied Genetics and Cell Biology and Department of Biotechnology University of Natural Resources and Life Sciences w Wiedniu (Austria) oraz 2nd Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol w Pradze (Czechy).

3. „PROGRES – Program rozwoju: Gospodarka-Edukacja-Sukces” (POKL.04.01.01-00-077/10)

Program realizowany był przez Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, Priorytet IV Szkolnictwo wyższe i nauka, Poddziałanie 4.1.1 Wzmocnienie potencjału dydaktycznego uczelni. W okresie maj – lipiec w 2014 roku odbyłam staż naukowo – dydaktyczny w School of Biological Sciences, University of East Anglia, Norwich w Anglii.

4. ERASMUS+

Obecnie, od 2017 roku pełnię również funkcję koordynatora programu Erasmus+ Instytutu Nauk Medycznych Wydziału Lekarskiego i Nauk o Zdrowiu UJK w Kielcach.

6.2. Aktywny udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych

Jestem współautorem 28 doniesień pokonferencyjnych, na których prezentowane były wyniki prowadzonych badań. Brałam czynny udział w 20 konferencjach krajowych, międzynarodowych lub zagranicznych. Na ostatniej konferencji wygłosiłam wykład na temat Badań genetycznych w raku trzustki.

Wykaz konferencji i prezentowanych badań:

1. Adamus-Białek W., Parniewski P., Kaca W., 2005, Diagnostyka molekularna uropatogennych szczepów *Escherichia coli*, praca opublikowana w całości w materiałach zjazdowych **VIII Konferencji: „Biologia molekularna w diagnostyce chorób zakaźnych i biotechnologii”** SGGW, Warszawa
2. Adamus-Białek W., Sosnowski M., Parniewski P., 2007, TRS-PCR-based methodology for diagnostics, differentiation and epidemiology of UPEC strains, **13th European Congress on Biotechnology**, Barcelona, Spain
3. Parniewski P., Wojtasik A., Majchrzak M., Adamus-Białek W., Augustynowicz-Kopec E., Zwolska Z., Dziadek J., 2008, New method of genetic identification and differentiation of *Mycobacterium* strains, **XXVI Conference of Polish Society of Microbiologists**, Szczecin, Poland
4. Adamus-Białek W., Wojtasik A., Majchrzak M., Parniewski P., 2009, TRS-PCR as a novel tool for uropathogenic *Escherichia coli* strains discrimination, **III National Conference BioMillenium “Molecular Biotechnology”**, Gdansk University of Technology, Gdansk, Poland, poster
5. Majchrzak M., Wojtasik A., Adamus-Białek W., Parniewski P., 2010, Trinucleotide repeat sequences in epidemiological investigations, **The First International Conference of Biological Sciences**, Cairo, Egypt
6. Wojtasik A., Majchrzak M., Adamus-Białek W., Augustynowicz-Kopec E., Zwolska Z., Dziadek J., Parniewski P., 2010, Trinucleotide Repeat Sequences-based PCR as a Potential Approach for Genotyping *Mycobacterium gordonae* Strains, **Nucleic Acids Conference**, Cancun/Puerto Morelos, Mexico
7. Adamus-Białek W., Zawadzki K., Kwinkowski M., Parniewski P., Kaca W., 2010, Resistance patterns of clinical isolates of uropathogenic *Proteus mirabilis* and *E. coli* and their β -lactamases diversity, **II workshop MIKROBIOT „Health and Environment Microbiology”**, University of Lodz, Poland
8. Glenska J., Adamus-Białek W., Kwinkowski M., Kolesinska B., Kaminski Z., Kaca W., 2011, The synthetic peptide library as tools for human antibody differentiation, **IV Congress of Polish Biotechnology and IV Eurobiotech 2011 “Four colours of biotechnology” Central European Congress of Life Sciences**, Krakow, Poland;

9. Lechowicz Ł., Adamus-Białek W., Kaca W., 2012, Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) spectroscopy as a method for differentiation of clinical *Escherichia coli* strains, **VII Conference „Young scientists towards the challenges of modern technology”**, Warsaw, Poland,
10. Adamus-Białek W., Zajac E., Parniewski P., Kaca W., 2012, Analysis of drug resistance of uropathogenic *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* strains, **XXVII CONGRESS Polish Society of Microbiologists: „Microbes without borders”**, Lublin, Poland,
11. Karwacka K., Palacz T., Bąk Ł., Adamus-Białek W., 2013, The microflora of selected water reservoirs in Świętokrzyskie Voivodship. **3rd Workshop on Microbiology in Health and Environmental Protection MIKROBIOT**, Łódź, Poland,
12. Lechowicz Ł., Urbaniak M., Adamus-Białek W., Kaca W., 2013, The use of IR spectrometry and Artificial Neural Networks to detect the susceptibility of *E. coli* to cephalothin, 3rd Workshop on Microbiology in Health and Environmental Protection MIKROBIOT, Łódź, Poland,
13. Wawszczak M., Kamińska E., Adamus-Białek W., 2014, Ocena lekowrażliwości uropatogennych szczepów *Escherichia coli*, **III Studencka Konferencja Biologii Molekularnej**; Łódź; Polska
14. Lechowicz Ł., Urbaniak M., Adamus-Białek W., Kaca W., 2014, Differentiation of ampicillin-resistant and ampicillin-sensitive *Escherichia coli* strains by using infrared spectroscopy and multilayer perceptron, **1st Congress of the Polish Biochemistry, Cell Biology, Biophysics and Bioinformatics BIO2014**; Warszawa; Polska,
15. Adamus-Białek W., Majchrzak M., Gad B., Mazur J., Kamińska E., Wawszczak M., Gniadkowski M., 2015, Genetic and phenotypic analysis of drug-resistance of uropathogenic *Escherichia coli* strains. **6th International Weigl Conference on Microbiology**, Gdańsk, Poland,
16. Adamus-Białek W., Derlatka D., Świercz M., Czerwonka G., 2015, Analysis of uropathogenic *Escherichia coli* forming biofilm upon different environment conditions. 6th International Weigl Conference on Microbiology, Gdańsk, Poland,
17. Gałczyńska K., Kurdziel K., Adamus-Białek W., Arabski M., 2015, The effect of nickel(II) chloride on biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli* strains. 6th International Weigl Conference on Microbiology, Gdańsk, Poland,
18. Gałczyńska K., Kurdziel K., Adamus-Białek W., Szary K., Arabski M., 2015, The effects of nickel(II) complexes with imidazole derivatives on pyocyanin and pyoverdine production by *Pseudomonas aeruginosa* strains. 6th International Weigl Conference on Microbiology, Gdańsk, Poland,
19. Lechowicz Ł., Chrapek M., Urbaniak M., Adamus-Białek W., Malinowska-Gniewosz A., Kaca W., 2015, Analysis of variability of uropathogenic *Escherichia coli* strains based on their infrared spectra, 6th International Weigl Conference on Microbiology, Gdańsk, Poland,
20. Wawszczak M., Adamus-Białek W., 2015, Microbiological contamination of food, **Central European Conference ECOpole'15**, Jarnołtówek, Poland,

21. Adamus-Białek M., Wawszczak M., Świercz A., 2015, Impact of sewage treatment plant on local environment, Central European Conference ECOpole'15, Jarnołtówek, Poland,
22. Adamus-Białek W., Filipiak A., Gwizda E., Kaleta J., Mąkosa M., Kaca W., Gniadkowski M., 2016, Analiza genetyczna i fenotypowa czynników chorobotwórczości uropatogennych szczepów *Proteus mirabilis*, **XXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów**, Bydgoszcz, Poland,
23. Adamus-Białek W., Wawszczak M., Głuszek S., Bucki R., Parniewski P., Bowater R., 2017, Factors that influence the genetic stability of CRISPR/cas systems in *Escherichia coli*, **“Microbiology in Health Care and Environmental Protection” - MIKROBIOT**, Łódź, Polska
24. Adamus-Białek W., Wawszczak M., Mazur J., Parniewski P., 2017, Subinhibitory concentration of antibiotics changes the bacteria, **Microbiology in Health Care and Environmental Protection” - MIKROBIOT**, Łódź, Polska
25. Gluszek S, Wawszczak M, Majchrzak M, Adamus-Bialek W, Klusek J, Nawacki L, Kozieł D, 2018, The mutations of carboxypeptidase 1 predisposes to distinguishing patients with acute pancreatitis and pancreatic cancer, **50th EPC The jubilee meeting of the European Pancreatic Club, 10th International Symposium on Inherited Diseases of the Pancreas**, Berlin, Germany
26. Kozieł D, Matykiewicz J, Wawszczak M, Majchrzak M, Adamus-Bialek W, Gluszek S, 2018, Follow-up as analysis tool of the potential long-term effects of SPINK, CTRC mutations in Acute Pancreatitis Patients, **50th EPC The jubilee meeting of the European Pancreatic Club, 10th International Symposium on Inherited Diseases of the Pancreas**, Berlin, Germany
27. Kujko AA, Oracz G, Fjeld K, Wejnarska K, Wertheim-Tysarowska K, Kołodziejczyk E, Bal J, Adamus-Białek W, Kozieł D, Kowalik A, Głuszek S, Molven A, Rygiel AM, 2018, Association between CEL-HYB1 allele and idiopathic/familial chronic pancreatitis in Polish pediatric patients, **50th EPC The jubilee meeting of the European Pancreatic Club, 10th International Symposium on Inherited Diseases of the Pancreas**, Berlin, Germany
28. Gluszek S, Wawszczak M, Adamus-Bialek W, Majchrzak M, Klusek J, Kozieł D, 2018, Coexistence of CPA1, SPINK1, CFTR, CTRC, PRSS1 Gene Mutations in Acute Pancreatitis and Pancreatic Cancer, **PANCREAS, 2018, 49th Annual Meeting of the American Pancreatic Association**, Miami Beach, Florida, USA
29. Adamus-Białek W., wykład pt. “Badania genetyczne w raku trzustki”, VI Sympozjum Postępy Chirurgii, 2019, Kielce, Polska

6.3. Udział w komitetach redakcyjnych i radach naukowych czasopism

W latach 2015 – 2017 byłam członkiem rady redakcyjnej (Editorial Board) trzech czasopism:

1. Journal of Agricultural Science and Engineering, American Institute of Science – Public Science Framework, członek rady naukowej – recenzent, członek rady redakcyjnej (Editorial Board)
2. Public Health and Preventive Medicine, American Institute of Science – Public Science Framework, członek rady naukowej – recenzent, członek rady redakcyjnej (Editorial Board)
3. Clinical Medicine Journal, American Institute of Science – Public Science Framework, członek rady naukowej – recenzent, członek rady redakcyjnej (Editorial Board)

6.4. Członkostwo w międzynarodowych i krajowych organizacjach oraz towarzystwach naukowych

Jestem współzałożycielem i członkiem zarządu oddziału terenowego w Kielcach Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów:

- 2009 – 2012 – sekretarz Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów Oddziału Kielce,
- 2012 – 2016 – wiceprzewodnicząca Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów Oddziału Kielce,
- 2016 – obecnie – przewodnicząca Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów Oddziału Kielce.

6.5. Opieka naukowa nad studentami

W latach 2009 – 2017 byłam promotorem 48 prac licencjackich na kierunku ochrona środowiska lub biotechnologia Wydziału Matematyczno – Przyrodniczego Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach. Wszystkie prace, z wyjątkiem jednej, miały charakter prac badawczych. Pełniłam również funkcję promotora 7 prac magisterskich na kierunku ochrona środowiska lub biotechnologia Wydziału Matematyczno – Przyrodniczego Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach. Wszystkie prace, miały charakter prac badawczych. Wyniki badań otrzymane dzięki współpracy naukowej ze studentami stanowiły częściowy wkład do 7 publikacji naukowych mojego dorobku naukowego.

Szczegółowy wykaz prac dyplomowych (Imię i Nazwisko studenta, tytuł pracy, kierunek studiów, rok):

Prace licencjackie:

1. Przemysław Wieliński, Analiza makroskopowa hodowli bakteryjnych wyizolowanych z zanieczyszczeń powietrza przygotowanych w Stacji Bazowej ZMŚP Święty Krzyż, ochrona środowiska, 2009
2. Monika Bębenek, Analiza mikroskopowa bakterii wyizolowanych z pyłu powietrza Stacji Bazowej ZMŚP Święty Krzyż, ochrona środowiska, 2009

3. Marta Okoń, Charakterystyka mikrobiologiczna powietrza jako środowiska wtórnego bytowania bakterii na podstawie analizy mikrobiologicznej zanieczyszczeń pyłowych wyizolowanych w Stacji Bazowej ZMŚP Święty Krzyż, ochrona środowiska, 2009
4. Ewelina Tarłowska, Analiza makroskopowa grzybów wyizolowanych z powietrza szczytu Gór Świętokrzyskich – Święty Krzyż, ochrona środowiska, 2009
5. Katarzyna Ziętał, Analiza mikrobiologiczna powietrza jako środowiska występowania bakterii na podstawie analizy mikrobiologicznej zanieczyszczeń pyłowych, wyizolowanych w Stacji Bazowej ZMŚP na Świętym Krzyżu, ochrona środowiska, 2009
6. Anna Kabała, Badanie zróżnicowania mikrobiologicznego powietrza szczytu Św. Krzyża gór Świętokrzyskich, ochrona środowiska, 2010
7. Marcin Zawada, Badanie ilości drobnoustrojów występujących w powietrzu wyizolowanych z pyłu badawczego Stacji Bazowej ZMŚP Święty Krzyż, ochrona środowiska, 2010
8. Albert Adamczyk, Park miejski jako azyl dla zanieczyszczonego środowiska miejskiego, na przykładzie podstawowych badań mikrobiologicznych powietrza. Ochrona środowiska, 2010
9. Beata Pacek, Badanie czystości mikrobiologicznej powietrza w pobliżu oczyszczalni ścieków, ochrona środowiska, 2010
10. Szczepan Duralski, Analiza mikrobiologiczna powietrza w pomieszczeniach o szczególnych wymaganiach higienicznych na przykładzie apteki, ochrona środowiska, 2010
11. Mia Galus, Badanie wpływu makro-środowiska na zróżnicowanie mikrobiologiczne powietrza na przykładzie pola i sadu, ochrona środowiska, 2010
12. Justyna Kasperek, Badanie wpływu makro-środowiska na zróżnicowanie mikrobiologiczne powietrza na przykładzie lasu liściastego i boru, ochrona środowiska, 2010
13. Iwona Wojtasik, Analiza mikrobiologiczna powietrza wewnętrznego na przykładzie kina, ochrona środowiska, 2010
14. Dorota Ziglińska, Analiza mikrobiologiczna osadu czynnego z wykorzystaniem wybranych technik molekularnych, ochrona środowiska, 2010
15. Monika Żurawska, Określenie zróżnicowania mikrobiologicznego rzeki Wisły w strefie przybrzeżnej, w miejscowości Zawichost, ochrona środowiska, 2010
16. Maciej Kusztal, Analiza mikrobiologiczna zbiornika w Końskich, ochrona środowiska, 2011
17. Michał Michałek, Charakterystyka mikrobiologiczna powietrza w Kielcach, ochrona środowiska, 2011
18. Joanna Niedziela-Wąsacz, Analiza mikrobiologiczna strefy przybrzeżnej wód powierzchniowych w Pińczowie, na przykładzie wybranych stanowisk badawczych, ochrona środowiska, 2011
19. Ewelina Sokołowska, Epidemiologia zakażeń produktów żywnościowych w województwie świętokrzyskim, ochrona środowiska, 2011
20. Bożena Taborska, Analiza czystości mikrobiologicznej potoku, stanowiącego dopływ rzeki Czarnej Staszowskiej w województwie świętokrzyskim, ochrona środowiska, 2011
21. Klaudia Tamborska, Bakterie środowiskowe jako źródło łatwo dostępnej broni biologicznej na podstawie analizy dostępnej literatury, ochrona środowiska, 2011
22. Katarzyna Wąsowska, Analiza mikrobiologiczna strefy przybrzeżnej rzeki Bernatka, w miejscowości Skarżysko-Kamienna, ochrona środowiska, 2011
23. Edyta Włodarczyk, Wpływ dżdżownicy *Eisenia fetida* na mikroflorę osadu dennego na osiedlu Białogon w Kielcach, ochrona środowiska, 2011
24. Remigiusz Ziewiecki, Charakterystyka mikroflory bakteryjnej strefy przybrzeżnej zbiornika wodnego, w rezerwacie przyrody "Wietrznia" w Kielcach, ochrona środowiska, 2011
25. Marzena Żydek, Analiza mikrobiologiczna osadu dennego na osiedlu Białogon w Kielcach, ochrona środowiska, 2011
26. Karolina Głuszek, Badanie wpływu oczyszczalni ścieków na czystość mikrobiologiczną powietrza w okolicy Szczecno, województwa świętokrzyskiego, ochrona środowiska, 2012
27. Artur Stefański, Wykorzystanie preparatów bakteryjnych w uprawie roślin na terenie woj. Świętokrzyskiego, ochrona środowiska, 2012

28. Ewelina Kamińska, Analiza mikrobiologiczna kąpielisk w powiecie piotrkowskim w latach 2008 – 2010, ochrona środowiska, 2012
29. Klaudia Kulig, Występowanie i diagnostyka *Enterococcus faecalis* w powierzchniowych ujęciach wód pitnych na rzece Nidzie, w latach 2006 – 2011, ochrona środowiska, 2012
30. Paulina Kowalska, Występowanie bakterii *Escherichia coli* w powierzchniowych ujęciach wód pitnych, na rzece Nidzie, województwa świętokrzyskiego, w latach 2005-2011, ochrona środowiska, 2012
31. Ewelina Bech, Gospodarowanie osadem ściekowym na oczyszczalni ścieków w Pińczowie, ochrona środowiska, 2012
32. Martyna Drabik, Analiza sanitarna osadów ściekowych na przykładzie wybranych oczyszczalni ścieków w województwie świętokrzyskim, ochrona środowiska, 2012
33. Wioleta Nowaczek, Analiza występowania drobnoustrojów wskaźnikowych w produktach żywnościowych na przykładzie szczepów *Listeria monocytogenes* w miejscowości Sandomierz, w latach 2008 – 2010, ochrona środowiska, 2012
34. Diana Berlińska, Występowanie drobnoustrojów środowiskowych, powodujących zanieczyszczenia produktów spożywczych, na przykładzie analizy próbek w miejscowości Busko Zdrój w latach 2009 i 2011, ochrona środowiska, 2013
35. Karolina Karwacka, Analiza sanitarna osadów dennych wybranych zbiorników wodnych województwa świętokrzyskiego, biotechnologia, 2013
36. Tomasz Palacz, Mikrobiologiczna analiza sanitarna wybranych zbiorników wodnych województwa świętokrzyskiego, biotechnologia, 2013
37. Ewelina Kamińska, Ocena lekooporności uropatogennych szczepów *Escherichia coli* na wybrane antybiotyki, biotechnologia, 2014
38. Krystyna Huleyeva, Identyfikacja genów *sdia* i *rcaA* warunkujących zdolność do tworzenia biofilmu w uropatogennych szczepach *Escherichia coli*, biotechnologia, 2014
39. Monika Wawszczak, Identyfikacja szczepów wytwarzających beta-laktamazy o rozszerzonym spektrum działania w kolekcji uropatogennych szczepów *Escherichia coli*, biotechnologia, 2014
40. Sylwia Chrzanowska, Charakterystyka izolatów bakteryjnych *Escherichia coli* na podstawie wrażliwości na wybrane antybiotyki, ochrona środowiska, 2015
41. Justyna Magdalena Mazur, Identyfikacja metodą PCR genów warunkujących lekooporność na antybiotyki beta-laktamowe w kolekcji uropatogennych szczepów *E. coli*, biotechnologia, 2015
42. Beata Gad, Identyfikacja genów warunkujących lekooporność na wybrane antybiotyki w kolekcji uropatogennych szczepów *Escherichia coli*, biotechnologia, 2015
43. Joanna Kaleta, Badanie zdolności do tworzenia biofilmu w kolekcji szczepów *Proteus mirabilis*, ochrona środowiska, 2016
44. Ewa Gwizda, Próba korelacji wzrostu rozpełzłego z biofilmem szczepów *Proteus mirabilis*, biotechnologia, 2016
45. Aneta Filipiak, Próba korelacji wzrostu rozpełzłego z właściwościami ureolitycznymi szczepów *Proteus mirabilis*, biotechnologia, 2016
46. Martyna Gulba, Wpływ wybranych antybiotyków na intensywność tworzenia biofilmu szczepów *Escherichia coli*, biotechnologia, 2016
47. Paulina Bator, Analiza sekwencji genów topoizomerazy uropatogennych szczepów bakterii *Escherichia coli* metodami bioinformatycznymi, biotechnologia, 2017
48. Klaudia Wróbel, Porównanie sekwencji genów gyrazy w uropatogenach szczepów *E. coli* metodami bioinformatycznymi, biotechnologia, 2017

Prace magisterskie:

1. Joanna Niedziela-Wąsacz, Analiza molekularna w korelacji z metodami fenotypowymi w różnicowaniu drobnoustrojów środowiskowych, ochrona środowiska, 2013

2. Katarzyna Wąsowska, Różnicowanie drobnoustrojów izolowanych z gleb metodami fenotypowymi i genotypowymi, ochrona środowiska, 2013
3. Anna Szafraniec, Wpływ niklu na wzrost i rozwój biofilmu w kolekcji szczepów *Proteus mirabilis*, ochrona środowiska, 2015
4. Anna Szafraniec, Wpływ chlorku niklu na wzrost i rozwój biofilmu bakteryjnego w kolekcji szczepów *Escherichia coli*, biotechnologia, 2016
5. Monika Wawszczak, Wpływ subinhibicyjnych stężeń antybiotyków na zmiany lekooporności uropatogennych szczepów *Escherichia coli*, biotechnologia, 2016
6. Marzena Mąkosa, Badanie wybranych czynników patogenności w kolekcji uropatogennych szczepów klinicznych *Proteus mirabilis*, biotechnologia, 2017
7. Justyna Magdalena Mazur, Analiza porównawcza mutantów i szczepów dzikich *Escherichia coli* z wykorzystaniem metody PCR, biotechnologia, 2017

Rozpoczynając pracę w Samodzielnym Zakładzie Ochrony i Kształtowania Środowiska na UJK w roku 2008 opracowałam karty przedmiotu i dostosowałam laboratorium do zajęć dydaktycznych na kierunku ochrona środowiska z przedmiotów “Genetyka i inżynieria genetyczna”, “Mikrobiologia”, “Mikrobiologia wód”, “Analiza biochemiczno-biofizyczna w badaniach skażeń ustrojów”. Przygotowałam również program nauczania z przedmiotu “Organizmy modyfikowane genetycznie” na kierunku biotechnologia. Zajęcia miały charakter laboratoriów, ćwiczeń oraz wykładów.

Podczas pracy w Instytucie Nauk Medycznych brałam udział w przystosowaniu laboratoriów oraz opracowaniu zajęć dydaktycznych z przedmiotu “Mikrobiologia”, “Parazytologia”, “Genetyka”, “Żywność modyfikowana genetycznie” na kierunku lekarskim. Przygotowałam i prowadzę równorzędne zajęcia dydaktyczne (z wyjątkiem mikrobiologii) na kierunku lekarskim anglojęzycznym.

Jestem koordynatorem programu Erasmus+ w Instytucie Nauk Medycznych WLiNoZ UJK.

6.6. Opieka naukowa nad doktorantami w charakterze opiekuna naukowego lub promotora pomocniczego

Jestem promotorem pomocniczym dwóch prac doktorskich:

- mgr Andrzej Szczepanek, rozprawa doktorska pt. “Czynniki warunkujące występowanie bakterii *Legionella* w szpitalach i domach pomocy społecznej na terenie województwa świętokrzyskiego”, otwarty przewód doktorski w dziedzinie nauk o zdrowiu, na Wydziale Lekarskim i Nauk o Zdrowiu, UJK, promotor dr hab. Grażyna Nowak- Starz, prof. UJK
- mgr Monika Wawszczak, rozprawa doktorska pt. “Rola karboksypeptydazy w mechanizmie powstawania ostrego zapalenia trzustki”, otwarty przewód doktorski w dziedzinie nauk o zdrowiu, na Wydziale Lekarskim i Nauk o Zdrowiu, UJK, promotor prof. dr hab. n. med. Stanisław Głuszek

6.7. Staże w zagranicznych i krajowych ośrodkach naukowych lub akademickich

Data i Miejsce	Charakter pobytu i efekty
VIII – XII. 2012 Karolinska Institute: Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology (MTC), Sztokholm, Szwecja	Poznanie nowych technik mikrobiologii i biologii molekularnej, udział w badaniach: analiza fenotypowa i genetyczna uropatogennych szczepów <i>Escherichia coli</i> , wpływ wolnych rodników tlenowych na wzrost i biofilm <i>E. coli</i> . Efektem jest nawiązanie współpracy naukowej i publikacja Adamus-Białek W*, Vollmerhausen TL, Janik K, Hydrogen peroxide stimulates uropathogenic <i>Escherichia coli</i> strains to cellulose production, 2018, <i>Microb Pathog</i> , 126:287-291 (IF 2,332)
V – VII. 2014 School of Biological Sciences, University of East Anglia, Norwich, Anglia	Poszerzenie umiejętności w zakresie technik biologii molekularnej. Badanie stabilności sekwencji CRISPR w genomie szczepów <i>Salmonella</i> spp., przygotowanie plazmidowego konstruktów genowego zawierającego sekwencje powtórzone TRS. Efektem jest nawiązanie współpracy naukowej i uzyskanie wyników badań wstępnych dotyczących niestabilności sekwencji CRISPR w genomach uropatogennych szczepów <i>Escherichia coli</i> . Otrzymane obiecujące wyniki oraz nawiązana współpraca naukowa są podstawą do rozpoczęcia nowego kierunku badań i pozwolą na przygotowania projektu Sonata Bis do NCN.
I. 2017 Katedra Biologii Ogólnej i Parazytologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa, Polska	Staż szkoleniowy – diagnostyka parazytologiczna. Staż posłużył do poszerzenia kompetencji zawodowych w zakresie parazytologii i przygotowania dydaktycznego do zajęć prowadzonych na nowo otwartym kierunku lekarskim na Wydziale Lekarskim i Nauk o Zdrowiu UJK

6.8. Recenzowanie publikacji w czasopismach międzynarodowych i krajowych

Od 2015 roku jestem zapraszana do recenzji manuskryptów oryginalnych prac badawczych i przeglądowych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym i zagranicznym. W sumie zrecenzowałam 58 manuskryptów w 31 czasopismach, z których 11 posiada Impact Factor w zakresie od 0,5 – 13,7.

Lp.	Nazwa czasopisma	Okres	Liczba zrecenzowanych manuskryptów publikacji	Punkty IF (MNiSzW)
1.	Microbiology Research International	2015	1	0
2.	African Journal of Microbiology Research	2015 – 2016	3	0
3.	Clinical Medicine Journal	2015 – 2016	4	0
4.	Agricultural and Biological Sciences Journal	2015 – 2017	5	0
5.	Public Health Journal	2015	2	0
6.	Journal of Agricultural Science and Engineering	2015 – 2017	9	0
7.	International Journal of Preventive Medicine Research	2015	1	0
8.	American Journal of Clinical Neurology and Neurosurgery	2015	1	0
9.	Public Health and Preventive Medicine	2015 – 2016	2	0
10.	Acta Biochimica Polonica	2015	3	1,239 (15)
11.	Journal of Antimicrobial Chemotherapy	2015	1	5,217 (40)
12.	American Journal of Microbiology and Immunology	2016	2	0,91
13.	AASCIT Frontiers in Biomedical Sciences	2016 – 2017	2	0
14.	Studia Medyczne	2016 – 2018	3	(10)
15.	African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines	2017	1	0,553 (20)
16.	International Journal of Environmental Research and Public Health	2017	1	2,145 (30)
17.	ACS Nano	2017	1	13.709 (45)
18.	ACTA PHARMACEUTICA	2017	1	1,623 (20)
19.	European Journal of Biological Research	2018	1	0

20.	Genes	2018	1	3,191 (25)
21.	Microbial Cell Factories	2018	1	4,295 (40)
22.	Microbial Drug Resistance	2018	1	2,344 (25)
23.	Clinical Microbiology and Infectious Diseases	2018	2	0
24.	Biomolecules	2018	1	0
25.	JSM Biomedical Imaging Data Papers	2018	1	0
26.	Annals of Clinical and Medical Microbiology	2018	1	0
27.	Journal of Case Reports and Studies	2019	1	0
28.	African Health Sciences	2019	2	0,666 (20)
29.	Journal of Surgery and Surgical Research	2019	1	0
30.	Science Asia	2019	1	0
31.	Infection and Drug Resistance	2019	1	0

6.9. Współpraca naukowo-badawcza z innymi ośrodkami naukowymi

W latach 2009 – 2018 nawiązałam współpracę naukową z licznymi ośrodkami naukowymi, co zaowocowało nabyciem nowych doświadczeń naukowych i laboratoryjnych oraz wspólnymi publikacjami, udziałem w konferencjach czy wsparciem merytorycznym.

Współpraca naukowa:

1. Pracownia Genetyki Molekularnej, Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi, dr hab. Paweł Parniewski, prof. PAN
2. School of Biological Sciences, University of East Anglia, Norwich, prof Richard Bowater,
3. Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology (MTC), Karolinska Institute, Sztokholm, Szwecja, prof. Annelie Brauner
4. Katedra Geotechniki i Inżynierii Wodnej, Politechnika Świętokrzyska, Kielce, dr Łukasz Bąk
5. Narodowy Instytut Leków, Warszawa, Polska, prof. dr hab. Marek Gniadkowski, dr Anna Baraniak
6. Zakład Mikrobiologii, Instytut Biologii, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach, prof. dr hab. Wiesław Kaca
7. Zakład Biochemii i Genetyki, Instytut Biologii, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach, dr hab. Michał Arabski, prof. UJK,
8. Instytut Matematyki, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach, dr Magdalena Chrapek, dr Elżbieta Zajac

Wioletta Adamus-Białek⁶¹