

# **Autoreferat**

**dr n. wet. Agata Dorota Bancercz-Kisiel**

*Katedra Epizootiologii*

*Wydział Medycyny Weterynaryjnej*

*Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie*

**1. Imię i nazwisko**

Agata Dorota Bancercz-Kisiel

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej**

- 2009** Stopień naukowy: doktor nauk weterynaryjnych w zakresie epizootiologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie; tytuł rozprawy doktorskiej: Zastosowanie metody multiplex PCR do oceny zależności między występowaniem genu *ymoA* a sekrecją enterotoksyn Yst przez *Yersinia enterocolitica*,
- 2005** Tytuł: lekarz weterynarii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie.

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

- 01.01.2011 do chwili obecnej** Adiunkt, Katedra Epizootiologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie,
- 01.01.2010 – 31.12.2010** Asystent, Katedra Epizootiologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie,
- 01.10.2005 – 20.11.2009** Doktorant, Katedra Epizootiologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie.

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

**4. 1. Osiągnięcie pod tytułem**

**„Charakterystyka bioserotypowa i molekularna szczepów *Yersinia enterocolitica* wyizolowanych od różnych gatunków zwierząt wolno żyjących”**

tworzy jednotematyczny cykl następujących publikacji:

**Publikacja przeglądowa stanowiąca wstęp:**

**4. 1. 1. Banczerz-Kisiel A.\***, Szweda W. (2015) Yersiniosis – zoonotic foodborne disease of relevance to public health. *Ann. Agri. Environ. Med.* 22: 397-402. **MNiSW<sub>2015</sub> 20, IF<sub>2014</sub> 1,126**

*Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zebraniu piśmiennictwa oraz wykonaniu całokształtu prac związanych z przygotowaniem wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 90%.*

\* autor korespondencyjny

**Publikacje oryginalne:**

**4. 1. 2. Banczerz-Kisiel A.\***, Szczerba-Turek A., Lipczyńska K., Stenzel T., Szweda W. (2012) Bioserotypes and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* strains isolated from mallards (*Anas platyrhynchos*) and pheasants (*Phasianus colchicus*). *J. Food Prot.* 75: 2219-2222. **MNiSW<sub>2012</sub> 30, IF<sub>2012</sub> 1,832**

*Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu większości analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków oraz przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.*

\* autor korespondencyjny

**Praca nagrodzona Doroczną Nagrodą PTNW III stopnia za rok 2012.**

**4. 1. 3. Banczerz-Kisiel A.\***, Szczerba-Turek A., Platt-Samoraj A., Socha P., Szweda W. (2014) Bioserotypes and virulence markers of *Y. enterocolitica* strains isolated from roe deer (*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*). *Pol. J. Vet. Sci.* 17: 315-319. **MNiSW<sub>2014</sub> 20, IF<sub>2014</sub> 0,604**

*Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników,*

*sformułowaniu wniosków oraz przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.*

*\* autor korespondencyjny*

**4. 1. 4. Banczerz-Kisiel A. \***, Platt-Samoraj A., Szczerba-Turek A., Syczyło K., Szweda W. (2015) The first pathogenic *Yersinia enterocolitica* bioserotype 4/O:3 strain isolated from a hunted wild boar (*Sus scrofa*) in Poland. *Epidemiol. Infect.* 143: 2758-2765. **MNiSW<sub>2015</sub> 30, IF<sub>2014</sub> 2,535**

*Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu większości analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków oraz przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.*

*\* autor korespondencyjny*

**4. 1. 5. Banczerz-Kisiel A. \***, Socha P., Szweda W. (2016) Detection and characterisation of *Yersinia enterocolitica* strains in cold-stored carcasses of large game animals in Poland. *Vet. J. Vet. J.* 208: 102-103. **MNiSW<sub>2015</sub> 40, IF<sub>2014</sub> 1,693**

*Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków oraz przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 90%.*

*\* autor korespondencyjny*

Łączna punktacja 5 prac, wchodzących w skład jednotematycznego cyklu publikacji, zgodnie z rokiem opublikowania w czasopismach indeksowanych w bazie Journal Citation Reports (JCR) wynosi **140 punktów MNiSW**. Łączny współczynnik wpływu (**IF**) wynosi **7,790**.

Publikacje 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3 oraz 4.1.5 powstały jako efekt badań finansowanych z projektu badawczego własnego N N308 609338, przyznanego przez MNiSW na lata 2010-2014 (**kierownik projektu**). Praca 4.1.4 jest wynikiem badań realizowanych w ramach jednego z zadań projektu rozwojowego NR12 0126 10, przyznanego przez NCBiR na lata 2011-2014 (**wykonawca projektu**).

## 4. 2. Omówienie osiągnięcia naukowego

### 4.2.1. Wprowadzenie i cel przeprowadzonych badań

Rodzaj *Yersinia* został opisany po raz pierwszy w 1944 r. i nazwany tak na cześć Aleksandra Yersina, który wraz z Shibasaburo Kitasato odkrył nowy rodzaj bakterii w trakcie epidemii dżumy w Honkongu [40]. Dwadzieścia lat później Wilhelm Frederiksen [13] ustalił taksonomię *Yersinia (Y.) enterocolitica* łącząc ten gatunek z rodzajem *Yersinia* i wprowadzając go do rodziny *Enterobacteriaceae*. Obecnie na rodzaj *Yersinia* składa się osiemnaście gatunków: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. philomiragia*, *Y. ruckeri*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y. intermedia*, *Y. aldovae*, *Y. rhodei*, *Y. bercovieri*, *Y. molaretii*, *Y. aleksiciae*, *Y. massiliensis*, *Y. similis*, *Y. entomophaga*, *Y. nurmii* i *Y. pekkanenii*, z których trzy pierwsze są chorobotwórcze dla zwierząt i ludzi [3, 40]. *Y. enterocolitica* jest Gram (-) pałeczką, charakteryzującą się zdolnością do przeżywania i namnażania w niskich temperaturach. W Polsce drobnoustroj wyizolowano po raz pierwszy od pacjentów z ostrymi bólami brzucha w 1971 r. [24].

*Y. enterocolitica*, w oparciu o określone cechy biochemiczne, takie jak zdolność do fermentacji trehalozy, ksylozy, eskuliny czy wytwarzania pirazynamidazy oraz esterazy Tweenu, podzielono na sześć biotypów: 1A, 1B, 2, 3, 4 i 5 [41]. Za najbardziej chorobotwórcze dla ludzi uważa się szczepy należące do biotypu 1B; za średnio chorobotwórcze szczepy biotypów 2 – 5, a za niechorobotwórcze szczepy biotypu 1A. Chemiczne zróżnicowanie termostabilnego antygeny somatycznego O stało się natomiast podstawą do wyróżnienia ponad 70 grup serologicznych, między którymi istnieje pokrewieństwo antygenowe [40]. Do niedawna panował pogląd, iż w Europie przypadki kliniczne jersiniozy wywoływane są głównie przez szczepy serotypu O:3, rzadziej O:9, natomiast w Ameryce Północnej i Japonii przez serotypy O:8 i O:5,27. Jednakże dane epidemiologiczne z ostatnich lat pozwalają sądzić, iż podział ten ulega stopniowemu zatarciu [13, 30]. Dodatkowo serotyp O:8 zaczęto stwierdzać u szczepów biotypu 1A [23, 33], co sugeruje, że dopiero określenie tzw. bioserotypu pozwala na wstępną klasyfikację badanego szczepu do określonej grupy patogenności.

Biorąc pod uwagę fakt, iż badania bakteriologiczne, biotypowanie i serotypowanie są procedurami pracochłonnymi i czasochłonnymi, zaczęto wprowadzać metody molekularne do

badań nad szczepami *Y. enterocolitica*. Opierają się one w głównej mierze na wykrywaniu tzw. markerów zjadliwości, kodujących produkcję białek ułatwiających bakteriom wniknięcie do wrażliwego organizmu, jego zasiedlenie, uniknięcie odpowiedzi immunologicznej, a także wzrost w niesprzyjających warunkach. Najbardziej charakterystycznym markerem zjadliwości *Y. enterocolitica* jest pYV (plasmid of *Yersinia* virulence), wielkości 64-75 pz (par zasad), działający jak czynnik antyfagocytarny. W obrębie plazmidu zlokalizowanych jest kilka genów bezpośrednio związanych z chorobotwórczością, m. in. *yadA*, *yop*, *ysc* czy *virF*, kodujących odpowiednio adhezynę YadA (*Yersinia* adhesin), białka wydzielnicze Yops (*Yersinia* outer membrane proteins), kompleks sekrecyjny Ysc (*Yersinia* secretion complex) oraz regulatorowy aktywator transkrypcji VirF (transcriptional activator of the *Yersinia* virulence regulon) [16].

Określanie patogennego potencjału pałeczek *Y. enterocolitica* wyłącznie w oparciu o markery plazmidowe prowadzi niejednokrotnie do uzyskiwania wyników fałszywie ujemnych. Ich przyczyną może być samoczynne „gubienie” plazmidu wirulencji w przypadku zbyt długiego przechowywania szczepów, licznych pasażów, czy działania temperatury powyżej 37°C [17]. Dużo lepszym rozwiązaniem wydaje się poszukiwanie stabilnych genetycznie, chromosomalnych markerów zjadliwości, takich jak *ail*, *inv*, *myf* i *yst*, kodujących odpowiednio białko Ail (attachment-invasion locus), inwazyję Inv (invasin), białko fimbrialne MyfA (mucoid *Yersinia* factor/fibrillae A) i enterotoksyny Yst (*Yersinia*-stable toxin) [40]. Wykrywanie chromosomalnych markerów zjadliwości jest szczególnie istotne w przypadku szczepów biotypu 1A, powszechnie uznawanych za niechorobotwórcze, nie posiadających plazmidu, a coraz częściej izolowanych z klinicznych przypadków jersiniozy u ludzi [1, 26, 31].

Jednym z najistotniejszych chromosomalnych markerów zjadliwości *Y. enterocolitica*, są geny *yst*, kodujące produkcję enterotoksyn Yst – ułatwiających drobnoustrojowi wnikanie do wnętrza tkanek przez uszkodzony nabłonek jelitowy. Toksyny te są syntetyzowane jako łańcuchy polipeptydowe, składające się z 30-aminokwasowej domeny C-terminalnej, stanowiącej dojrzałą cząstkę toksyny i 18-aminokwasowej N-terminalnej sekwencji sygnałnej, odcinanej w trakcie transportu przez błonę cytoplazmatyczną [36]. Aktualnie wyróżnia się enterotoksynę YstI (A, B i C) oraz stosunkowo niedawno odkrytą, słabo jeszcze poznaną, enterotoksynę YstII. Pierwsze szczepy bakteryjne izolowane z przypadków

klinicznych produkowały termostabilną enterotoksynę o małej masie cząsteczkowej, zwaną YstA [37]. Wykazywała ona aktywność w próbie na oseskach mysich, a zatem nieodzwrotnie przyczyniała się do wywoływania biegunki przez szczepy biotypów 1B i 2-5, u których występuje gen kodujący produkcję tej enterotoksyny.

Biotyp 1A bardzo rzadko produkuje enterotoksynę YstA, jednakże ponad 80% szczepów zawiera gen *ystB*, kodujący produkcję homologicznej, aktywnej biologicznie enterotoksyny, określanej jako YstB. Ponadto, minimalna dawka oczyszczonej enterotoksyny YstB (0,4 pmol) jest znacznie niższa niż analogiczna dawka enterotoksyny YstA (7,6 pmol), co wskazuje na siłę jej oddziaływania w jelitach [29]. Opisano także wariant YstC enterotoksyny – wyjątkowo rzadko stwierdzany oraz wariant YstII – również aktywny biologicznie, ale o zupełnie innym mechanizmie działania i niezidentyfikowanym genie kodującym produkcję enterotoksyny [37]. Pod względem właściwości fizykochemicznych, antygenowych oraz mechanizmu działania enterotoksyny YstI wykazują duże podobieństwo do toksyny STI (STa), produkowanej przez *Escherichia (E.) coli*, wyrażające się aktywacją cyklazy guanylowej, powodującej wzrost stężenia cyklicznego guanozynomonofosforanu (cGMP) w komórkach nabłonka i gromadzenie płynów w świetle jelit [8, 32].

Istotnym chromosomalnym markerem zjadliwości jest również gen *ail*, kodujący produkcję białka Ail – polipeptydu o masie 17 kDa, odgrywającego istotną rolę na wstępnych etapach zakażenia. Białko Ail umożliwia bakteriom przyleganie i wnikanie do wnętrza komórek eukariotycznych oraz indukowanie ich oporności na działanie przeciwciał i układu dopełniacza [40]. W logarytmicznej fazie wzrostu synteza Ail następuje w temp. 30°C, a w fazie stacjonarnej ekspresja genu *ail* zachodzi tylko w temp. 37°C. Sekwencje homologiczne do genu *ail* wykrywano dotychczas jedynie u szczepów *Y. enterocolitica* powiązanych epidemiologicznie z procesami chorobowymi u ludzi. Fakt ten wykorzystywany był przez wielu badaczy do opracowywania technik PCR umożliwiających odróżnienie szczepów chorobotwórczych od niechorobotwórczych [15, 21, 38, 42]. Jednakże ostatnie doniesienia wskazują na obecność genu *ail* także u szczepów biotypu 1A, uważanych za niepatogenne [7, 10, 23, 33]. Wykazano również, iż sekwencje nukleotydowe genów *ail* biotypu 1A i najbardziej chorobotwórczego biotypu 1B różnią się jedynie pojedynczą mutacją [23, 33].

Zastosowanie metod biologii molekularnej, umożliwiających wykrywanie markerów zjadliwości *Y. enterocolitica* w materiale klinicznym, pozwala na szybką diagnostykę zakażeń

i wprowadzenie prawidłowego leczenia jersiniozy u ludzi. Choroba ta jest bowiem jedną z istotniejszych zoonoz, podlegających od 2002 r. obowiązkowi rejestracji i umieszczenia w corocznym raporcie EFSA (European Food Safety Authority – Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności). Według ostatnich doniesień EFSA, *Y. enterocolitica* jest trzecim najważniejszym czynnikiem etiologicznym biegunek u ludzi, po *Campylobacter spp.* i *Salmonella spp.* [9]. Jednakże raporty EFSA, odnoszące się do liczby przypadków jersiniozy w Polsce, pozostają w rozbieżności z danymi publikowanymi przez Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny (NIZP-PZH). Meldunki epidemiologiczne NIZP-PZH, dotyczące zachorowań na choroby zakaźne, donoszą np. o zarejestrowaniu w 2010 r. 208 przypadków jersiniozy na tle *Y. enterocolitica*, podczas gdy raport EFSA dotyczący tego samego roku wskazuje na zaledwie 59 takich przypadków. Zatem jednoznaczna ocena sytuacji epidemiologicznej jersiniozy w Polsce jest utrudniona.

Epidemiologia zakażeń *Y. enterocolitica* jest złożona i nie do końca wyjaśniona. Wiadomo, że patogen występuje globalnie w środowiskach lądowym i wodnym oraz u różnych gatunków zwierząt, zwłaszcza świń. Wzrost liczebności populacji trzody chlewnej sprzyja rozprzestrzenianiu zakażeń w fermach i pomimo iż objawy jersiniozy u świń występują rzadko, to nosicielstwo *Y. enterocolitica* jest zjawiskiem powszechnym [3, 4]. Dodatkowo, biorąc pod uwagę istnienie korelacji pomiędzy szczepami występującymi u trzody chlewnej a szczepami chorobotwórczymi dla człowieka, należy stwierdzić, że gatunek ten jest głównym rezerwuarem szczepów patogennych dla ludzi [2, 5, 11, 25]. Sytuację epidemiologiczną komplikuje fakt, iż poza trzodą chlewną bardzo ważnym rezerwuarem są polne i leśne gryzonie, które przyczyniają się do szybkiego rozprzestrzeniania drobnoustroju w środowisku naturalnym [14, 18]. Obecność pałeczek *Y. enterocolitica* stwierdzano w zbiornikach wodnych, takich jak rzeki, strumienie i stawy [6], ale także u różnych gatunków zwierząt, w tym towarzyszących [27] oraz wolno żyjących [15, 21, 38].

Niestety, zarówno w literaturze światowej, jak i krajowej, bardzo mało jest doniesień poświęconych ocenie rozprzestrzenienia *Y. enterocolitica* w populacji zwierząt wolno żyjących. A stanowią one interesujący temat badawczy ze względu na fakt, iż najczęściej występują w małych liczebnie populacjach i istnieje duża trudność w pozyskaniu od nich materiału badawczego. Dodatkowo, w aspekcie weterynaryjnym oraz szeroko pojętego zdrowia publicznego badania zwierząt wolno żyjących mają istotne znaczenie, ponieważ



bardzo często stanowią one rezerwuar patogenów groźnych dla zdrowia i życia innych gatunków zwierząt oraz człowieka. Należy również uwzględnić fakt, iż wraz z rozwojem wiedzy i edukacji, wzrasta w społeczeństwie zdolność do wiązania niewłaściwego sposobu odżywiania z rozwojem chorób cywilizacyjnych, co wymusza poszukiwanie surowców alternatywnych do mięsa zwierząt gospodarskich żywionych w sposób intensywny. Jedną z tych alternatyw jest dziczyzna. Roczna, światowa produkcja mięsa ze zwierząt wolno żyjących oscyluje w granicach 1,7 mln ton, a na podstawie danych FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations – Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa) państwami o przypuszczalnie najwyższej produkcji dziczyzny są: Niemcy, Szwecja, Polska i Hiszpania [34]. Biorąc pod uwagę fakt, iż dziczyzna znajduje coraz częściej uznanie konsumentów ze względu na swoje walory smakowe i zdrowotne oraz uwzględniając główną, tj. alimentarną drogę zakażenia człowieka należy stwierdzić, iż mięso pochodzące od zwierząt wolno żyjących, poddane nieodpowiedniej obróbce termicznej może stanowić potencjalne źródło zakażenia *Y. enterocolitica* dla ludzi. Dodatkowo sposób patroszenia zwierząt, odbywający się w warunkach polowych, uniemożliwiających zastosowanie odpowiednich środków higieny, stwarza możliwość ekspozycji myśliwych na zakażenie, a tusz i środowiska na zanieczyszczenie pałeczkami *Y. enterocolitica*.

Biorąc pod uwagę wszystkie powyżej przedstawione aspekty zdecydowano się na przeprowadzenie badań, których wyniki stanowią istotę przedstawianego do oceny osiągnięcia. Celem przeprowadzonych badań była ocena występowania *Y. enterocolitica* u różnych gatunków zwierząt wolno żyjących oraz dokładna charakterystyka bioserotypowa i molekularna wyizolowanych szczepów. Do badań wybrano gatunki, których mięso spożywane jest w Polsce najczęściej: dziki, sarny, jelenie, kaczki krzyżówki i bażanty. Dodatkowo badaniami objęto tusze zwierząt łownych, przechowywane w warunkach chłodniczych przez okres co najmniej tygodnia, aby ustalić, czy niskie temperatury oraz ewentualne zanieczyszczenie tusz przy patroszeniu, mają wpływ na liczbę i rodzaj izolowanych szczepów *Y. enterocolitica*. W metodyce zastosowano badania bakteriologiczne, biotypowanie, serotypowanie i badania molekularne, przy pomocy których poszukiwano trzech markerów zjadliwości – amplikonów chromosomalnych genów *ail*, *ystA* i *ystB*.

Charakterystyka jersiniozy jako ważnej odzwierzęcej choroby pochodzenia pokarmowego, stanowiąca przedmiot niniejszego wprowadzenia, opublikowana została w pracy przeglądowej, będącej wstępem do omawianego osiągnięcia (4.1.1). Natomiast wyniki badań opublikowane w pozostałych pracach – oryginalnych (4.1.2, 4.1.3, 4.1.4, 4.1.5) uzyskano przy zastosowaniu metodyki opisanej poniżej.

## **4.2.2. Materiały i metody**

### **4.2.2.1. Materiał badawczy**

Materiał do badań stanowiło łącznie 840 wymazów pobranych od różnych gatunków zwierząt wolno żyjących, w różnym odstępie czasu od odstrzału:

- a) 90 wymazów z kloaki pobranych bezpośrednio po odstrzale od 45 kaczek krzyżówek,
- b) 32 wymazy z kloaki pobrane bezpośrednio po odstrzale od 16 bażantów,
- c) 48 wymazów z prostnicy pobranych bezpośrednio po odstrzale od 24 saren,
- d) 32 wymazy z prostnicy pobrane bezpośrednio po odstrzale od 16 jeleni,
- e) 302 wymazy z prostnicy pobrane bezpośrednio po odstrzale od 151 dzików,
- f) 336 wymazów z 56 tusz zwierząt łownych przechowywanych w chłodni, w temp.  $4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  przez okres 7–10 dni od odstrzału.

Od każdego zwierzęcia pobierane były dwie próbki, ze względu na psychrofilne właściwości *Y. enterocolitica* i konieczność stosowania dwóch rodzajów hodowli, tzw. ciepłej i zimnej. W przypadku tusz zwierząt łownych przechowywanych w warunkach chłodniczych z każdej tuszy pobierano 6 wymazów, po dwa z trzech miejsc próbkobrania: z okolicy migdałków podniebiennych, z okolicy mięśnia najdłuższego grzbietu oraz z okolicy odbytu.

### **4.2.2.2. Badania bakteriologiczne**

Pierwszy z każdej pary wymazów umieszczano w 9 ml podłoża ITC (bulion z irgasanem<sup>TM</sup>, tykarcyliną i chloranem potasu) – hodowla ciepła, a drugi w 9 ml podłoża PSB (bulion z peptonem, sorbitolem i solami żółci) – hodowla zimna. ITC inkubowano w temp.  $25^{\circ}\text{C}$  przez 48 godz., podczas gdy PSB inkubowano w temp.  $4^{\circ}\text{C}$  przez 3 tygodnie. Po odpowiednim dla danego rodzaju hodowli okresie inkubacji na podłożu namnażającym,

dalszy tok postępowania był identyczny dla obu hodowli. Przy użyciu sterylnej pipety przenoszono 0,5 ml hodowli do 4,5 ml 0,5% roztworu KOH i przez około 20 sek. wstrząsano w próbówce. Następnie dokonywano posiewu 0,1 ml materiału na powierzchnię płytki z agarem CIN (agar z cefsulodyną, irgasanem i nowobiocyną), w sposób umożliwiając otrzymanie pojedynczych kolonii (posiew sektorkowy). Płytki odwracano i inkubowano w temp. 30°C przez 24-48 godz. Dalsza identyfikacja biochemiczna przebiegała według normy PN-EN ISO 10273, umożliwiającej wstępną selekcję potencjalnie chorobotwórczych szczepów *Y. enterocolitica*, które wykorzystano do dalszych badań.

#### 4.2.2.3. Bioserotypowanie

Badania mające na celu określenie biotypu badanych szczepów *Y. enterocolitica* przeprowadzono według schematu zawartego w normie PN-EN ISO 10273, opartego na doniesieniach Wautersa [39]. Polegały one na wykazaniu zdolności do fermentacji trehalozy, ksylozy, eskuliny oraz na wykrywaniu pirazynamidazy, esterazy Tweenu i indolu. Określanie grupy serologicznej badanych szczepów *Y. enterocolitica* wykonano przy użyciu testu aglutynacji szkiełkowej. Jako antygeny używano żywych komórek bakteryjnych z 24-godz. hodowli na agarze krwawym (Graso), surowice dla antygenów somatycznych O:3, O:5, O:8, O:9 i O:27 pochodziły z firmy ITEST (Czechy). Komórki badanego szczepu zawieszano w kropli 0,85% NaCl, naniesionej na szkiełko podstawowe, łączono z kroplą surowicy naniesionej obok i mieszano przy użyciu ezy bakteriologicznej. Wystąpienie aglutynacji z jedną z pięciu użytych surowic po 1 min. wytrząsaniu uznawano za wynik dodatni. W przypadku braku aglutynacji z którąkolwiek z surowic, szczep uznawano za nietypujący się (NI – nonidentified).

#### 4.2.2.4. Triplex PCR

Izolacja genomowego DNA odbywała się przy użyciu kitu „Genomic Mini” firmy A&A Biotechnology (Gdynia), przeznaczonego do izolacji DNA z bakterii, hodowli komórkowych i tkanek stałych, wykorzystującego zdolność wiązania się genomowego DNA do ziół krzemionkowych w wysokich stężeniach soli chaotropowych. Izolację wykonywano według instrukcji producenta. Metoda triplex PCR obejmowała amplifikację trzech genów: *ail*, *ystA* i *ystB*. Sekwencje starterów zsyntetyzowanych w Pracowni Sekwencjonowania DNA Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk zaczerpnięto z publikacji Harnetta i

wsp. (*ail*, *ystA*) [20] oraz Platt-Samoraj i wsp. (*ystB*) [28]. Triplex PCR przeprowadzano przy użyciu HotStarTaq Plus DNA Polymerase (Qiagen) i HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen). Mieszanina reakcyjna o objętości 20 µl zawierała: około 120 ng wyizolowanego DNA (od 1 do 3 µl), 10 µl HotStarTaq Plus Master Mix 2x, 2 µl CoralLoad Concentrate 10x, po 0,1 µl każdego ze starterów (stężenie końcowe 0,5 µM), całość uzupełniano do 20 µl RNase-Free Water. Do każdej reakcji stosowano trzy kontrole: dwie pozytywne – z DNA wyizolowanym ze szczepów referencyjnych: ACTT 23715 (bioserotyp 1B/O:8) i O:5 z własnej kolekcji oraz jedną negatywną, bez DNA. Reakcję przeprowadzano w termocyklerze Mastercycler firmy Eppendorf. Zoptymalizowane warunki reakcji obejmowały: wstępną 5 min. denaturację w temp. 95°C, a następnie 30 cykli z kolejnymi etapami: denaturacją w temp. 94°C przez 30 sek., przyłączeniem starterów w temp. 54°C (praca 4.1.2) lub 45°C (prace 4.1.3, 4.1.4, 4.1.5) przez 30 sek. oraz elongacją w temp. 72°C przez 1 min. Po ostatniej reakcji następowała końcowa synteza łańcucha w temp. 72°C przez 10 min. Różne temperatury przyłączania starterów wynikały z innych temperatur mięknięcia dla poszczególnych dostaw starterów. Po rozdziale elektroforetycznym w 2% żelu agarozowym, wielkość uzyskiwanych produktów oceniano przez porównanie ze standardem mas GeneRuler™ 100 bp (base pairs – pary zasad) Ladder Plus (Fermentas). W triplex PCR poszukiwano odpowiednio fragmentów: genu *ail* o wielkości 356 pz, genu *ystA* o wielkości 134 pz i genu *ystB* o wielkości 180 pz. Wyniki elektroforezy archiwizowano przy użyciu systemu dokumentacji żeli GelDoc (Bio-Rad). Wybrane amplikony oczyszczano przy użyciu zestawu CleanUp (A&A Biotechnology) i sekwencjonowano (Genomed) celem potwierdzenia ich specyficzności.

### 4.2.3. Wyniki i dyskusja

#### 4.2.3.1. Charakterystyka bioserotypowa i molekularna szczepów *Y. enterocolitica* wyizolowanych od kaczek krzyżówek (*Anas platyrhynchos*)

Wykrywanie potencjalnie chorobotwórczych szczepów *Y. enterocolitica* u dzikiego ptactwa migrującego ma szczególne znaczenie epidemiologiczne. Sposób odstrzału dziko żyjących gatunków ptaków, wykorzystujący nabój śrutowy, stwarza możliwość zanieczyszczenia tuszki pałeczkami *Y. enterocolitica* pochodzącymi z przestrzelonego śruciną przewodu pokarmowego. Dodatkowo, dzikie kaczki jako zwierzęta wykorzystujące akweny

wodne, mogą zanieczyszczać naturalne zbiorniki, a spożycie wody z takiego zbiornika prowadzić może do zakażenia zwierząt i ludzi. Z tego względu w badaniach własnych zdecydowano się na poszukiwanie w wymazach z kloaki kaczek krzyżówek potencjalnie chorobotwórczych szczepów *Y. enterocolitica* celem dokonania ich bliższej charakterystyki i wykazania obecności markerów zjadliwości charakterystycznych dla szczepów patogennych dla ludzi. Dla porównania przeprowadzono także badania bażantów, których środowiskiem życia jest ograniczona przestrzeń lądowa. Uzyskane w badaniach własnych wyniki wnoszą nowe dane do istniejącego stanu wiedzy na temat występowania *Y. enterocolitica* u dzikiego ptactwa. Odsetek izolatów *Y. enterocolitica* uzyskanych od kaczek krzyżówek wynosił 11.1%, pałeczki *Y. enterocolitica* stwierdzono u 5 z 45 badanych kaczek. Wyizolowanie *Y. enterocolitica* tylko z hodowli zimnej potwierdziło konieczność prowadzenia obu rodzajów hodowli dla właściwej oceny sytuacji epidemiologicznej. Wszystkie izolaty *Y. enterocolitica* należały do biotypu 1A, co potwierdził wynik badań molekularnych, w których dzięki zastosowaniu triplex PCR uzyskano produkty wielkości 180 pz, świadczące o obecności amplikonów genu *ystB*, charakterystycznego dla tego biotypu. Szczególnie interesujące okazały się wyniki serotypowania wyizolowanych szczepów *Y. enterocolitica*, albowiem aż 3 z 5 szczepów należały do serotypu O:8, przypisywanego standardowo biotypowi 1B, uważanemu za najbardziej chorobotwórczy dla człowieka. Występowanie bioserotypu 1A/O:8 obserwowano jak dotąd rzadko – w Chinach (świnie, bydło, kozy, psy), w Wielkiej Brytanii (świnie) oraz w Indiach (ludzie z kliniczną jersiniozą). Od bażantów nie wyizolowano pałeczek *Y. enterocolitica*.

Reasumując, po przeprowadzeniu pierwszych w Polsce badań dotyczących występowania *Y. enterocolitica* u dzikich kaczek i bażantów stwierdzono, że kaczka krzyżówka może być nosicielem, siewcą i potencjalnym źródłem zakażenia pałeczkami *Y. enterocolitica*. Wyizolowane szczepy należały w większości do rzadko spotykanego na świecie bioserotypu 1A/O:8 i charakteryzowały się obecnością amplikonów genu *ystB*, co może przekładać się na potencjalne zagrożenie dla człowieka. Wyniki przeprowadzonych badań opublikowano w pierwszej pracy oryginalnej, wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego:

**Banczerz-Kisiel A.,** Szczerba-Turek A., Lipczyńska K., Stenzel T., Szweda W. (2012) Bioserotypes and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* strains isolated from mallards (*Anas platyrhynchos*) and pheasants (*Phasianus colchicus*). J. Food Prot. 75: 2219-2222.

#### **4.2.3.2. Charakterystyka bioserotypowa i molekularna szczepów *Y. enterocolitica* wyizolowanych od saren (*Capreolus capreolus*) i jeleni (*Cervus elaphus*)**

Wolno żyjące przeżuwacze mogą stanowić środowiskowy rezerwuuar patogenów groźnych dla innych zwierząt oraz dla człowieka. Jednym z takich drobnoustrojów jest niewątpliwie *Y. enterocolitica*. Dotychczas w naszym kraju nikt nie prowadził badań poświęconych wykrywaniu tego patogenu w populacji wolno żyjących przeżuwaczy. Jedynie Koronkiewicz i wsp. [22] wykryli *Yersinia spp.* u 18,2% poddanych badaniom jeleni – nie wykazali natomiast do jakiego gatunku należały wyizolowane szczepy, jaki miały biotyp, serotyp i czy posiadały markery zjadliwości. Biorąc pod uwagę powyższe, zdecydowano się na przeprowadzenie badań z wykorzystaniem wymazów z prostnicy saren i jeleni w różnym wieku, pobieranych bezpośrednio po odstrzale zwierząt w północno-wschodnim regionie Polski. Badania wykazały obecność dwóch szczepów *Y. enterocolitica* w próbkach pobranych od saren. Co ciekawe, oba szczepy pochodziły od jednego zwierzęcia (dorosła samica), ale z różnych rodzajów hodowli. Oba szczepy zakwalifikowano do biotypu 1A, ale podczas gdy szczep uzyskany z PSB należał do serotypu O:5, to szczep wyizolowany z ITC nie typował się serologicznie (NI). Takie zjawisko świadczyć może o istnieniu zakażenia mieszanego u badanej sarny. Zastosowanie triplex PCR do oceny obecności markerów zjadliwości *ail*, *ystA* i *ystB* wykazało, że oba szczepy posiadały amplikony genu *ystB*. W przypadku jeleni również wyizolowano dwa szczepy *Y. enterocolitica*, ale od dwóch różnych zwierząt (dorosłe samce). Oba szczepy należały do biotypu 1A, serotypu NI, natomiast uzyskano je z różnych rodzajów hodowli. Wyizolowane szczepy charakteryzowały się obecnością amplikonów genu *ystB*, co może budzić niepokój biorąc pod uwagę coraz częstsze przypadki jersiniozy wywoływanej przez szczepy biotypu 1A (produkujące enterotoksynę YstB) oraz uwzględniając fakt, iż mięso wolno żyjących przeżuwaczy, podobnie jak wołowina, może być spożywane na surowo (tatar, krwiste steki).

Reasumując, po przeprowadzeniu pierwszych tak dokładnych badań dotyczących występowania *Y. enterocolitica* u saren i jeleni w Polsce, wykazano że oba gatunki mogą być

nosicielami, siewcami i potencjalnym źródłem zakażenia pałeczkami *Y. enterocolitica*. Przeprowadzone badania są jednymi z nielicznych na świecie stosujących metody molekularne do charakterystyki izolatów *Y. enterocolitica* pochodzących od dziko żyjących przeżuwaczy. Wyniki przeprowadzonych badań opublikowano w drugiej pracy oryginalnej, wchodzącej w skład zgłaszanego osiągnięcia:

**Banczerz-Kisiel A.**, Szczerba-Turek A., Platt-Samoraj A., Socha P., Szweda W. (2014) Bioserotypes and virulence markers of *Y. enterocolitica* strains isolated from roe deer (*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*). Pol. J. Vet. Sci. 17: 315-319.

#### **4.2.3.3. Charakterystyka bioserotypowa i molekularna szczepów *Y. enterocolitica* wyizolowanych od dzików (*Sus scrofa*)**

Dziki stanowią niezwykle interesującą grupę badawczą, będąc wolno żyjącym gatunkiem zwierząt blisko spokrewnionym z trzodą chlewną – głównym rezerwuarem szczepów *Y. enterocolitica* patogennych dla ludzi. Z tego względu podjęto badania z wykorzystaniem wymazów z prostnicy 151 dzików, odstrzelonych w ramach realizacji planu Polskiego Związku Łowieckiego w różnych regionach Polski, celem izolacji i charakterystyki pałeczek *Y. enterocolitica*. Wyizolowano 40 szczepów, z których większość (32) pochodziła od zwierząt z regionu północnej Polski. Dwanaście izolatów pochodziło z hodowli ciepłej, podczas gdy 28 z hodowli zimnej. Zdecydowana większość szczepów należała do bioserotypu 1A/NI, zidentyfikowano również pojedyncze szczepy bioserotypów 1A/O:8, 1A/O:27, 1B/NI, 2/NI oraz 2/O:9. Najistotniejszym rezultatem przeprowadzonych badań była izolacja pierwszego w Polsce chorobotwórczego szczepu *Y. enterocolitica* bioserotypu 4/O:3 od zwierząt wolno żyjących. Stanowi to ważne odkrycie w aspekcie szeroko pojętego zdrowia publicznego, gdyż zachorowania ludzi na jersiniozę w naszym kraju, ale także w Europie (raporty EFSA), wywoływane są w większości przez szczepy należące do tego bioserotypu. Badania molekularne potwierdziły obecność amplikonów genów *ail* i *ystA* u szczepu bioserotypu 4/O:3, podczas gdy pozostałe szczepy wykazywały obecność amplikonów genu *ystB*. Co ważne, udało się również wyizolować pierwsze w Polsce i bardzo rzadkie na świecie (do chwili obecnej opisano zaledwie 5 takich izolatów) *ail*-pozytywne szczepy biotypu 1A. Wykazano bowiem, iż u 11 z 34 szczepów tego biotypu, oprócz amplikonów genu *ystB* występują również amplikony genu *ail*. Ciekawego spostrzeżenia dokonano także u połowy z

8 przypadków, w których od jednego zwierzęcia wyizolowano dwa szczepy *Y. enterocolitica*. Okazało się bowiem, iż szczepy te różnią się od siebie biotypem, serotypem lub posiadanymi markerami zjadliwości, co może wskazywać na występowanie zakażenia mieszanego dwoma różnymi szczepami *Y. enterocolitica* u badanych zwierząt.

Reasumując, po przeprowadzeniu badań dotyczących występowania *Y. enterocolitica* u dzików w Polsce, potwierdzono iż mogą być one nosicielami, siewcami i potencjalnym źródłem zakażenia pałeczkami *Y. enterocolitica*. Wykazano również, że prewalencja *Y. enterocolitica* u dzików z północnego i centralnego regionów Polski jest większa w odniesieniu do regionu południowego. Wyizolowano pierwszy szczep chorobotwórczego dla ludzi bioserotypu 4/O:3 od zwierząt wolno żyjących w Polsce oraz niezwykle rzadkie na świecie *ail*-pozytywne szczepy biotypu 1A. Wyniki przeprowadzonych badań opublikowano w trzeciej pracy oryginalnej, wchodzącej w skład zgłaszanego osiągnięcia:

**Banczerz-Kisiel A., Platt-Samoraj A., Szczerba-Turek A., Syczyło K., Szweda W. (2015)** The first pathogenic *Yersinia enterocolitica* bioserotype 4/O:3 strain isolated from a hunted wild boar (*Sus scrofa*) in Poland. *Epidemiol. Infect.* 143: 2758-2765.

#### **4.2.3.4. Charakterystyka bioserotypowa i molekularna szczepów *Y. enterocolitica* wyizolowanych z tusz zwierząt łownych przechowywanych w warunkach chłodniczych**

*Y. enterocolitica* jako typowy psychrofil nie tylko przeżywa, ale także namnaża się w niskich temperaturach – w produktach spożywczych przechowywanych w warunkach chłodniczych (5°C) z  $1 \times 10^1$ /ml do  $2,8 \times 10^7$ /ml w ciągu 5 dni [12]. W produktach spożywczych poddanych mrożeniu (-18°C) zachowuje swoje właściwości chorobotwórcze przez bardzo długi okres czasu, stanowiąc potencjalne zagrożenie dla konsumentów [19]. Dodatkowo, w niskich temperaturach może produkować enterotoksyny Yst, które są odporne na działanie temp. 121°C przez 30 min., a w temp. 4°C i przy niskim pH zachowują swoje właściwości toksyczne przez kilka miesięcy, pozostając stabilne w zakresie pH 1-11 [35]. Biorąc pod uwagę powyższe fakty należy stwierdzić, iż przechowywanie tusz w warunkach chłodniczych może sprzyjać namnażaniu *Y. enterocolitica* oraz produkcji enterotoksyn, co wydaje się szczególnie niepokojące w odniesieniu do tusz zwierząt łownych, zwłaszcza wolno żyjących przeżuwaczy, których mięso może być spożywane na surowo. Z tego względu podjęto badania mające na celu ocenę występowania pałeczek *Y. enterocolitica* w



tuszach zwierząt łownych przechowywanych w chłodni oraz dokładną charakterystykę wyizolowanych szczepów. Próbkę pobrano z tusz 20 saren, 16 jeleni i 20 dzików, od każdego zwierzęcia po 6 wymazów (po dwa z trzech różnych miejsc próbkobrania). Szczepy *Y. enterocolitica* wyizolowano z 12 na 20 (60%) tusz saren, 7 na 16 (43,8%) tusz jeleni oraz 11 na 20 (55%) tusz dzików. Spośród wyizolowanych 52 szczepów *Y. enterocolitica*, 19 pochodziło z okolicy odbytu, 17 z okolicy mięśnia najdłuższego grzbietu oraz 16 z okolicy migdałków podniebiennych. Tylko jeden szczep pozyskano z hodowli ciepłej (ITC). Dominującym bioserotypem, stwierdzanym u ponad 50% izolatów był bioserotyp 1A/NI. Bioserotypy 1A/O:8 i 1A/O:5 stanowiły odpowiednio 15,4% i 13,5% badanych szczepów *Y. enterocolitica*. Pozostałe bioserotypy stwierdzano u pojedynczych szczepów. Z zastosowaniem metody triplex PCR wykazano obecność amplikonów genu *ystB* u wszystkich badanych szczepów. Ponadto, szczepy izolowane z tej samej tuszy, ale z różnych miejsc, czy różnych rodzajów hodowli, charakteryzowały się dużym zróżnicowaniem biotypowym i serotypowym.

Reasumując, przeprowadzone badania wykazały wysoki stopień zanieczyszczenia tusz zwierząt łownych przechowywanych w warunkach chłodniczych pałeczkami *Y. enterocolitica*. Prezentowane wyniki są efektem pierwszych w Polsce i jednych z nielicznych na świecie badań poświęconych temu zagadnieniu. Są to również pierwsze badania oceniające stopień zanieczyszczenia tusz pałeczkami *Y. enterocolitica* w trzech różnych obszarach anatomicznych. Wyniki przeprowadzonych badań opublikowano w czwartej pracy oryginalnej, wchodzącej w skład zgłaszanego osiągnięcia:

**Banczerz-Kisiel A., Socha P., Szweda W. (2016) Detection and characterisation of *Yersinia enterocolitica* strains in cold-stored carcasses of large game animals in Poland. Vet. J. 208: 102-103.**

#### **4.2.4. Podsumowanie i wnioski**

Badania mające na celu ocenę rozprzestrzenienia zakażeń *Y. enterocolitica* w populacji zwierząt wolno żyjących są istotne, zarówno w kontekście naukowym, jak i epidemiologicznym. Uzyskane wyniki, w postaci izolacji pierwszego w Polsce chorobotwórczego szczepu *Y. enterocolitica* bioserotypu 4/O:3 od dzika, czy wyizolowania pierwszych w Polsce i nielicznych na świecie *ail*-pozytywnych szczepów biotypu 1A, a także

pierwsze w Polsce badania nad występowaniem *Y. enterocolitica* u kaczek krzyżówek, bażantów i wolno żyjących przeżuwaczy oraz badania nad stopniem zanieczyszczenia tusz zwierząt łownych przechowywanych w warunkach chłodniczych świadczą o nowatorskim charakterze przedstawianego do oceny osiągnięcia. Przeprowadzone badania, oprócz aspektu naukowego, posiadają również ważny aspekt aplikacyjny. Przetwórstwo przemysłowe, w tym przetwórstwo spożywcze, jest jednym z kluczowych sektorów gospodarki kraju. Czynności mające na celu wzrost konkurencyjności kraju poprzez poprawę stanu zdrowia zwierząt, czystości poubojowej tusz i jakości zdrowotnej produktów pochodzenia zwierzęcego są w naszym kraju działaniem priorytetowym. Wyniki badań wskazujące, iż tusze poszczególnych gatunków zwierząt łownych przechowywane w warunkach chłodniczych są zanieczyszczone pałeczkami *Y. enterocolitica* w znacznie większym stopniu, niż ma to miejsce w przypadku badania zwierząt bezpośrednio po odstrzale są niezwykle ważnym ustaleniem, wskazującym na konieczność poprawy procedur higienicznych w ochronie zdrowia publicznego.

Wnioski wynikające z przeprowadzonych badań:

1. Kaczki krzyżówki, sarny, jelenie i dziki są środowiskowymi rezerwuarami, nosicielami i potencjalnym źródłem zakażenia *Y. enterocolitica* dla człowieka.
2. Tusze zwierząt łownych przechowywane w warunkach chłodniczych są w bardzo dużym stopniu zanieczyszczone pałeczkami *Y. enterocolitica*.
3. Szczepy *Y. enterocolitica* izolowane od zwierząt wolno żyjących w Polsce reprezentują głównie bioserotyp 1A/NI.
4. Zwierzęta wolno żyjące w Polsce mogą być źródłem zakażenia rzadko spotykanymi w świecie szczepami *Y. enterocolitica* bioserotypu 1A/O:8.
5. Chorobotwórczy dla człowieka bioserotyp 4/O:3 *Y. enterocolitica* może być izolowany od dzików w Polsce, co potwierdzają wyniki badań molekularnych, opierających się na wykazaniu markerów zjadliwości *ail* i *ystA*.
6. Od zwierząt wolno żyjących w Polsce można wyizolować niezwykle rzadkie w świecie *ail*-pozytywne szczepy biotypu 1A *Y. enterocolitica*.

#### 4.2.5. Piśmiennictwo

1. Batzilla J, Heesemann J, Rakin A. The pathogenic potential of *Yersinia enterocolitica* 1A. Int J Med Microbiol. 2011; 301: 556-561.
2. Boqvist S, Pettersson H, Svensson A, Andersson Y. Sources of sporadic *Yersinia enterocolitica* infection in children in Sweden, 2004: a case-control study. Epidemiol Infect. 2009; 6: 897-905.
3. Bottone EJ. *Yersinia enterocolitica*: revisitation of an enduring human pathogen. Clin Microbiol Newsl. 2015; 37: 1-8.
4. Bowman AS, Glendening C, Wittum TE, LeJeune JT, Stich RW, Funk JA. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in different phases of production on swine farms. J Food Prot. 2007; 70: 11-16.
5. Bucher M, Meyer C, Grötzbach B, Wacheck S, Stolle A, Fredriksson-Ahomaa M. Epidemiological data on pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Southern Germany during 2000-2006. Foodborne Pathog Dis. 2008; 5: 273-280.
6. Cheyne BM, Van Dyke MI, Anderson WB, Huck PM. An evaluation of methods for the isolation of *Yersinia enterocolitica* from surface waters in the Grand River watershed. J Water Health 2009; 7: 392-403.
7. Cheyne BM, Van Dyke MI, Anderson WB, Huck PM. The detection of *Yersinia enterocolitica* in surface water by quantitative PCR amplification of the *ail* and *yadA* genes. J Water Health 2010; 8: 487-499.
8. Delor I, Kaeckenbeeck A, Wauters G, Cornelis GR. Nucleotide Sequence of *yst*, the *Yersinia enterocolitica* Gene Encoding the Heat-Stable Enterotoxin, and Prevalence of the Gene among Pathogenic and Nonpathogenic *Yersiniae*. Infect. Immun. 1990; 58: 2983-2988.
9. EFSA – European Food Safety Authority. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. EFSA Journal 2013; 11: 3129-3379.
10. Falcão JP, Falcão DP, Pitondo-Silva A, Malaspina AC, Brocchi M. Molecular typing and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* strains from human, animal and food origins isolated between 1968 and 2000 in Brazil. J Med Microbiol. 2006; 55: 1539-1548.
11. Fosse J, Seegers H, Magras C. Prevalence and Risk Factors for Bacterial Food-Borne Zoonotic Hazards in Slaughter Pigs: A Review. Zoonoses Public Health 2009; 56: 429-454.
12. Francis DW, Spaulding PL, Lovett J. Enterotoxin production and thermal resistance of *Yersinia enterocolitica* in milk. Appl Environ Microbiol. 1980; 40: 174-176.
13. Frederiksen W. A study of some *Yersinia pseudotuberculosis*-like bacteria ("*Bact. enterocoliticum*" and "*Pasteurella X*"). Proceedings of the XIV<sup>th</sup> Scandinavian Congress of Pathology and Microbiology, 1964.
14. Fredriksson-Ahomaa M, Stolle A, Korkeala H. Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections. FEMS Immunol Med Microbiol. 2006; 47: 315-329.

15. Fredriksson-Ahomaa M, Wacheck S, Koenig M, Stolle A, Stephan R. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in wild boars in Switzerland. *Int J Food Microbiol.* 2009; 135: 199-202.
16. Gierczyński R. Evaluation of the usefulness of selected virulence markers for identification of virulent *Yersinia enterocolitica* strains. II. Genotypic markers associated with the pYV plasmid. *Med Dośw Mikrobiol.* 2000; 52: 35-49.
17. Gierczyński R. Evaluation of the usefulness of selected virulence markers for identification of virulent *Yersinia enterocolitica* strains. III. Chromosome markers of virulence. *Med Dośw Mikrobiol.* 2000; 52; 51-65.
18. Gürtler M, Alter T, Kasimir S, Linnebur M, Fehlhaber K. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in fattening pigs. *J Food Prot.* 2005; 68: 850-854.
19. Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms. <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/UCM297627.pdf>
20. Harnett N, Lin YP, Krishnan C. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* using the multiplex polymerase chain reaction. *Epidemiol Infect* 1996; 117: 59-67.
21. Joutsen S, Sarno E, Fredriksson-Ahomaa M, Cernela N, Stephan R. Pathogenic *Yersinia enterocolitica* O:3 isolated from a hunted wild alpine ibex. *Epidemiol Infect.* 2012; 141: 612-617.
22. Koronkiewicz A, Daczowska-Kozon E, Markiewicz K, Wojciechowska A, Żmuda E, Dąbrowski W. Game animals as carriers of enteric pathogens. *Folia Univ. Agric. Stetin.* 2004; 3: 79-84.
23. Kraushaar B, Dieckmann R, Wittwer M, Knabner D, Konietzny A, Mäde D, Strauch E. Characterization of a *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strain harbouring an *ail* gene. *J Appl Microbiol.* 2011; 111: 997-1005.
24. Malottke R, Dominowska C, Krajka K. Mesenteric lymphadenitis due to *Yersinia enterocolitica* (1st case in Poland) (in Polish) *Pol Tyg Lek.* 1971; 26: 1467-1468.
25. Martínez PO, Fredriksson-Ahomaa M, Sokolova Y, Roasto M, Berzins A, Korkeala H. Prevalence of enteropathogenic *Yersinia* in Estonian, Latvian, and Russian (Leningrad region) pigs. *Foodborne Pathog Dis.* 2009; 6: 719-724.
26. McNally A, Dalton T, La Ragione RM, Stapleton K, Manning G, Newell DG. *Yersinia enterocolitica* isolates of differing biotypes from humans and animals are adherent, invasive and persist in macrophages, but differ in cytokine secretion profiles *in vitro*. *J Med Microbiol.* 2006; 55: 1725-1734.
27. Platt-Samoraj A, Szweda W, Siwicki AK. The effect of dog and cat infections of *Yersinia enterocolitica* on the occurrence of human yersiniosis. *Med. Weter.* 2000; 56: 379-381.
28. Platt-Samoraj A, Ugorski M, Szweda W, Szczerba-Turek A, Wojciech Ł, Procajło Z. Analysis of The Presence of *ail*, *ystA* and *ystB* Genes In *Yersinia enterocolitica* Strains Isolated from Aborting Sows and Aborted Fetuses. *J Vet Med B* 2006; 53, 341-346.

29. Ramamurthy T, Yoshino KI, Huang X, Balakrish Nair G, Carniel E, Maruyama T. The novel heat-stable enterotoxin subtype gene (*ystB*) of *Yersinia enterocolitica*: Nucleotide sequence and distribution of the *yst* genes. *Microbial Pathogenesis* 1997; 23: 189-200.
30. Rastawicki W, Szych J, Gierczyński R, Rokosz N. A dramatic increase of *Yersinia enterocolitica* serogroup O:8 infections in Poland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009; 28: 535–537.
31. Ratnam S, Mercer E, Picco B, Parsons S, Butler R. A nosocomial outbreak of diarrhoea disease due to *Yersinia enterocolitica* serotype O:5, biotype 1. *J Infect Dis*. 1982; 145: 242-247.
32. Robins-Browne RM, Takeda T, Fasano A, Bordun AM, Dohi S, Kasuga H, Fong G, Prado V, Guerrant RL, Morris JG. Assessment of Enterotoxin Production by *Yersinia enterocolitica* and Identification of a Novel Heat-Stable Enterotoxin Produced by a Noninvasive *Y. enterocolitica* Strain Isolated from Clinical Material. *Infect Immun*. 1993; 61: 764-767.
33. Sihvonen LM, Hallanvuo S, Haukka K, Skurnik M, Siitonen A. The *ail* Gene Is Present in Some *Yersinia enterocolitica* Biotype 1A Strains. *Foodborne Pathog Dis*. 2011; 8: 455-457.
34. Simińska E, Bernacka H, Sadowski T. The global and domestic venison market situation. *Ann Warsaw Univ of Life Sc – SGGW, Anim Sci*. 2011; 50: 89–96.
35. Swaminathan B, Harmon MC, Mehlman IJ. *Yersinia enterocolitica*. *J Appl Bacteriol*. 1982; 52: 151-183.
36. Takao T, Yominaga N, Shimonishi Y, Hara S, Inoue T, Miyama A. Primary structure of the heat stable enterotoxin produced by *Yersinia enterocolitica*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984; 125: 845-851.
37. Tennant SM, Skinner NA, Joe A, Robins-Browne RM. Homologues of Insecticidal Toxin Complex Genes in *Yersinia enterocolitica* Biotype 1A and Their Contribution to Virulence. *Infect Immun*. 2005; 73: 6860-6867.
38. Wacheck S, Fredriksson-Ahomaa M, König M, Stolle A, Stephan R. Wild Boars as an Important Reservoir for Foodborne Pathogens. *Foodborne Pathog Dis*. 2010; 3: 307-312.
39. Wauters G, Kandolo K, Janssens M. Revised scheme of *Yersinia enterocolitica* biogrouping. *Contrib Microbiol Immunol*. 1987; 9: 14-21.
40. Wiśniewski J, Bielecki J. Virulence mechanisms of bacteria from the *Yersinia* genus. *Post Mikrobiol*. 1996; 35: 213-241.
41. Wren BW. The *Yersiniae* - a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol*. 2003; 1: 55-64.
42. Ye YW, Ling N, Han YJ, Wu QP. Detection and prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in refrigerated and frozen dairy products by duplex PCR and dot hybridization targeting the *virF* and *ail* genes. *J Dairy Sci*. 2014; 97: 6785-6791.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

### 5.1. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora

W trakcie realizacji studiów doktoranckich zainteresowałam się w sposób szczególnie tematyką jersiniozy – choroby odzwierzęcej o istotnym znaczeniu epidemiologicznym. Odbylałam w tym czasie szereg szkoleń umożliwiających realizację zaplanowanych w ramach pracy doktorskiej badań oraz wnikliwie zapoznałam się z piśmiennictwem z tego zakresu, efektem czego był współudział w publikacji przeglądowej poświęconej zagadnieniom *Y. enterocolitica* biotypu 1A (praca 5.1.1). Szczepy należące do tego biotypu w powszechnej opinii uważane są za niepatogenne, a w procesie rutynowej diagnostyki nie przywiązuje się dużej wagi do ich izolacji. Okazuje się jednak, iż coraz częściej szczepy biotypu 1A izolowane są z przypadków klinicznych jersiniozy u ludzi, co wskazuje na potrzebę bardziej wnikliwych badań poświęconych ich mechanizmom patogenności.

W okresie studiów doktoranckich moje zaciekawienie wzbudziła również tematyka występowania pałeczek *Y. enterocolitica* w organizmach zwierząt wolno żyjących. W literaturze światowej mało było doniesień naukowych poświęconych ocenie rozprzestrzenienia i właściwościom *Y. enterocolitica* w populacji zwierząt dzikich. Literatura krajowa w ogóle nie podejmowała tego zagadnienia – jedyna dostępna praca poświęcona była ogólnemu występowaniu pałeczek *Yersinia*, bez szczegółowej diagnostyki wyizolowanych szczepów. Podjęłam wówczas badania mające na celu ocenę występowania szczepów *Y. enterocolitica* w migdałkach podniebiennych dzików. Wielu autorów uważało, iż stwierdzenie obecności *Y. enterocolitica* w migdałkach świadczy niezbicie o zjawisku nosicielstwa i potencjalnego siewstwa drobnoustroju do środowiska. *Y. enterocolitica* wyizolowałam z dwóch z badanych 46 migdałków podniebiennych. Oba izolaty należały do biotypu 1A (serotypy O:5 i NT) i posiadały markery zjadliwości w postaci amplikonów genu *ystB*. Aplikacyjnym aspektem przeprowadzonych badań było opracowanie metody triplex PCR, służącej jednoczesnemu wykrywaniu amplikonów genów *ail*, *ystA* i *ystB*. Wyniki opublikowałam w pracy oryginalnej (praca 5.1.4). Byłam także zaangażowana w przygotowanie kolejnych dwóch publikacji przeglądowych, opracowanych w Katedrze Epizootiologii, a dotyczących molekularnych mechanizmów nowotworzenia *Papillomaviridae* u zwierząt i ludzi (praca 5.1.2) oraz klinicznych typów sarkoidów koni (praca 4.1.3). Wykaz publikacji z tego okresu zamieszczono poniżej:

- 5.1.1. Platt-Samoraj A., **Banczerz-Kisiel A.**, Szweda W. (2006) Zjadliwość *Yersinia enterocolitica* oraz znaczenie biotypu 1A w patogenezie jersiniozy. Med. Weter. 62, 1113-1115. (MNiSW 15; IF 0)
- 5.1.2. Szczerba-Turek A., Szweda W., Siemionek J., Platt-Samoraj A., **Banczerz-Kisiel A.**, Teodorowski P. (2007) Molekularne mechanizmy nowotworzenia *Papillomaviridae* u zwierząt i ludzi. Med. Weter. 63, 1145-1148. (MNiSW 10; IF 0)
- 5.1.3. Szczerba-Turek A., Siemionek J., Raś A., Platt-Samoraj A., Mikulska-Skupień E., **Banczerz-Kisiel A.**, Szweda W. (2009) Kliniczne typy sarkoidów koni. Med. Weter. 65, 827-829. (MNiSW 6; IF 0)
- 5.1.4. **Banczerz-Kisiel A.**\*, Szczerba-Turek A., Platt-Samoraj A., Socha P., Szweda W. 2009: Application of multiplex PCR for the evaluation of the occurrence of *ail*, *ystA* and *ystB* genes in *Yersinia enterocolitica* strains isolated from wild boars (*Sus scrofa*). Bull. Vet. Inst. Pulawy 53: 351-355. (MNiSW 15; IF 0,218)

\* autor korespondencyjny

## 5.2. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora

### 5.2.1. Badania nad czynnikami warunkującymi produkcję toksyn Yst przez szczepy *Y. enterocolitica* izolowane od trzody chlewnej oraz od ludzi

Ważne miejsce w moich zainteresowaniach naukowych zajmuje zagadnienie produkcji enterotoksyn Yst przez *Y. enterocolitica*. Enterotoksyny są jednymi z najistotniejszych czynników zjadliwości *Y. enterocolitica*, kodowanych chromosomalnie i ułatwiających drobnoustrojowi wnikanie do tkanek przez uszkodzony nabłonek jelitowy. Wykazano jednak, iż nie wszystkie szczepy posiadające geny *yst* produkują odpowiednie enterotoksyny, co sugeruje obecność tzw. „cichych genów”. Autorzy badający to zjawisko uważali, że jest ono spowodowane działaniem genu *ymoA*, kodującego produkcję histonopodobnego białka YmoA (*Yersinia* modulator), odgrywającego hamującą rolę w ekspresji różnych genów. Białko YmoA, o masie cząsteczkowej 8,1 kDa, zaliczane do rozrastającej się rodziny białek Hha (u *Yersinia enterocolitica* określanymi mianem YmoA), wykazuje podobieństwo do N-końcowych, zdimeryzowanych domen białek z grupy H-NS. Dotychczas dowiedziono, że *ymoA* działa hamująco na ekspresję genu *inv*, kodującego inwazyję, odpowiedzialną za

transport komórek bakteryjnych przez komórki M oraz uczestniczy w regulacji aktywatora transkrypcji VirF.

Badania mające na celu wykazanie, czy istnieje korelacja pomiędzy występowaniem genu *ymoA* a sekrecją enterotoksyn Yst przez *Y. enterocolitica*, wykonałam w ramach realizacji projektu badawczego promotorskiego N N308 320235. Zastosowanie metody multiplex PCR do wykrywania markerów zjadliwości *Y. enterocolitica* u szczepów wyizolowanych od trzody chlewnej wykazało obecność fragmentów genów *ystA* i *ymoA* u wszystkich badanych szczepów. Wynik ten wskazywał na potencjalną chorobotwórczość badanych szczepów dla człowieka, w odróżnieniu od większości dotychczasowych izolatów pochodzących od trzody chlewnej w Polsce, które reprezentowały tzw. szczepy środowiskowe, należące do biotypu 1A. Pomimo obecności fragmentów genu *ystA* u wszystkich badanych szczepów, pozytywny wynik próby biologicznej stwierdzono tylko u nielicznych izolatów, co potwierdzało słuszność stawianej przez innych autorów tezy o istnieniu „cichych” kopii tego genu. Wykluczyłam natomiast postulowaną przez innych badaczy hamującą rolę genu *ymoA* w ekspresji genu *ystA*, gdyż amplikony *ymoA* wykazano zarówno u szczepów produkujących toksyny w teście na oseskach mysich, jak i u szczepów nieaktywnych biologicznie. W badaniach nie wykazano zatem korelacji między posiadanymi molekularnymi markerami zjadliwości a zdolnością badanego szczepu do produkcji enterotoksyn.

Do badań włączyłam także szczepy *Y. enterocolitica* wyizolowane z przypadków klinicznych jersiniozy u ludzi. W ramach prowadzonych badań nawiązałam współpracę z Narodowym Instytutem Zdrowia Publicznego – Państwowym Zakładem Higieny, Wojewódzką Stacją Sanitarno-Epidemiologiczną w Olsztynie oraz prof. dr hab. Eugenią Gospodarek – prezesem Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. Zestawienie wyników badań szczepów pochodzących od trzody chlewnej, będącej najbardziej znaczącym rezerwuarem szczepów *Y. enterocolitica* chorobotwórczych dla człowieka, z wynikami badań szczepów wyizolowanych *stricto* z przypadków klinicznych jersiniozy u ludzi, było niezbędne w aspekcie znaczenia prowadzonych badań dla szeroko pojętego zdrowia publicznego. Wykazano, iż wszystkie szczepy wyizolowane od ludzi z biegunką, a zatem o potwierdzonej klinicznie zdolności do produkcji enterotoksyn, posiadają zarówno amplikony genu *ystA*, jak i genu *ymoA*.



Wyniki badań na szczepach wyizolowanych od trzody chlewnej przedstawiłam w rozprawie doktorskiej pt. „Zastosowanie metody multiplex PCR do oceny zależności między występowaniem genu *ymoA* a sekrecją enterotoksyn Yst przez *Yersinia enterocolitica*” (promotor: prof. dr hab. Wojciech Szweda), którą obroniłam 20.11.2009 roku na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Wyniki zaprezentowane w dysertacji, rozszerzone o wyniki badań na szczepach wyizolowanych z klinicznych przypadków jersiniozy od ludzi, zostały opublikowane w późniejszym okresie w czterech artykułach:

5.2.1.1. **Banczerz-Kisiel A.\***, Szczerba-Turek A., Szweda W. (2011) Application of the suckling mouse bioassay to assess the enterotoxic properties of *Yersinia enterocolitica* strains isolated from fattening pigs. Bull. Vet. Inst. Pulawy 55: 21-25. (MNiSW 20; IF 0,414)

5.2.1.2. **Banczerz-Kisiel A.\***, Szczerba-Turek A., Platt-Samoraj A., Szweda W. (2011) Application of multiplex PCR for the evaluation of the occurrence of *ystA*, *ystB*, *ystC* and *ymoA* genes in *Yersinia enterocolitica* strains from fattening pigs. Bull. Vet. Inst. Pulawy 55: 33-37. (MNiSW 20; IF 0,414)

5.2.1.3. **Banczerz-Kisiel A.\***, Szczerba-Turek A., Platt-Samoraj A., Szweda W. (2011) Isolation, biotyping and serotyping of *Yersinia enterocolitica* strains from fattening pigs. Bull. Vet. Inst. Pulawy 55: 39-43. (MNiSW 20; IF 0,414)

5.2.1.4. **Banczerz-Kisiel A.\***, Szczerba-Turek A., Platt-Samoraj A., Szweda W. (2012) Distribution of the *ymoA* and *ystA* genes and enterotoxins Yst production by *Yersinia enterocolitica* strains isolated from humans and pigs. Pol. J. Vet. Sci. 15: 609-614. (MNiSW 20; IF 0,570)

\* *autor korespondencyjny*

**5.2.2. Badania nad zastosowaniem metody real-time PCR do analizy polimorfizmu pojedynczych nukleotydów oraz oceny poziomu ekspresji genów warunkujących produkcję enterotoksyn *Y. enterocolitica***

W związku z odkryciem, iż samo wykazanie obecności ampikonów genów *ystA* i *ymoA* nie koreluje ze zdolnością badanego szczepu *Y. enterocolitica* do produkcji enterotoksyn, podjęłam badania mające na celu bardziej wnikliwą analizę tych genów. W ramach projektu badawczego własnego (N N308 609338), którego byłam kierownikiem, poszukiwano mutacji w genach *ystA* i *ymoA* oraz określano poziom ich ekspresji. Do badań wybrano 90 szczepów *Y. enterocolitica* o zróżnicowanych właściwościach toksynotwórczych, wyizolowanych od trzody chlewnej oraz 90 szczepów *Y. enterocolitica* z klinicznych przypadków jersiniozy u ludzi, o potwierdzonych zdolnościach do produkcji enterotoksyn. Wszystkie szczepy charakteryzowały się obecnością ampikonów genów *ystA* i *ymoA*. W badaniach zastosowano technikę real-time PCR, z analizą przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym, która dzięki zastosowaniu barwników interkalujących umożliwia detekcję oraz monitorowanie przyrostu produktu w każdym cyklu reakcji.

Do wykrywania i analizy mutacji, a dokładniej polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (SNP – Single Nucleotide Polymorphism) genów *ystA* i *ymoA*, opracowałam i zoptymalizowałam metodę HRM (High Resolution Melting). Identyfikacja mutacji następowała przez analizę krzywej topnienia produktu amplifikacji, wykreślanej w trakcie każdego eksperymentu. Metoda HRM, charakteryzująca produkt PCR, jest podobna do analizy standardowej krzywej topnienia, ale dostarcza znacznie większej ilości informacji dotyczących sekwencji, długości, zawartości par GC, czy obecności SNP. Analiza krzywych topnienia nie wykazała obecności mutacji we fragmentach genu *ystA* badanych szczepów *Y. enterocolitica*, izolowanych zarówno od zwierząt, jak i od ludzi. Natomiast w trakcie analizy polimorfizmu genu *ymoA*, u niektórych szczepów wykazano obecność dwóch mutacji punktowych: tranzycji A3387326G i insercji A w pozycji 3387368. Tranzycja A3387326G dotyczyła końcowego fragmentu regionu kodującego białko konserwatywne oraz kodonu stop, a insercja nukleotydu A występowała w obrębie regionu niekodującego w badanym obszarze i nie zmieniała ramki odczytu dla kodonu start genu *ymoA* znajdującego się w pozycji 3387372. Po analizie uzyskanych wyników stwierdzono, że dwie mutacje punktowe wykryte w badanej sekwencji nukleotydowej genu *ymoA* nie mają wpływu na właściwości toksynotwórcze badanego szczepu. A zatem, postulowany przez innych autorów wpływ mutacji genu *ymoA* na aktywację tzw. „cichych genów” *ystA* nie został potwierdzony. Wyniki badań opublikowano w pracy 5.2.2.1, a otrzymane sekwencje umieszczono w bazie danych GenBank.

Real-time PCR stosowany jest również do oceny poziomu ekspresji RNA w komórkach i tkankach. Pierwszym krokiem badania poziomu ekspresji jest izolacja RNA, w następnym etapie wyizolowany kwas nukleinowy przepisany jest na cDNA, które w dalszej kolejności używane jest podczas real-time PCR. Ponieważ ilość mRNA w danej komórce zależy od poziomu ekspresji odpowiedniego genu, możliwa jest analiza jego ekspresji. Technika ta pozwala zanotować zmiany dokonujące się na poziomie transkryptomu, czyli zestawu cząsteczek mRNA danego mikroorganizmu. Analiza względna poziomu ekspresji genów *ystA* i *ymoA*, przeprowadzona w kolejnym etapie realizacji projektu, nie wykazała jednoznacznej korelacji między poziomem tej ekspresji a zdolnością badanego szczepu do produkcji enterotoksyn. Obecnie wyniki są w trakcie opracowania i analizy statystycznej, której celem jest ustalenie, czy różnice w poziomie ekspresji genów *ystA* i *ymoA* w poszczególnych grupach badawczych są statystycznie istotne.

Metodę HRM zastosowałam również do analizy SNP genu *ystB* wyizolowanych w moich dotychczasowych badaniach szczepów *Y. enterocolitica* biotypu 1A. Analiza SNP genu *ystB* umożliwiła genotypowanie zgromadzonych izolatów. Efektem przeprowadzonych badań było zdefiniowanie czterech regularnych wzorców (G1, G2, G3, G4) oraz 10 wariacji, które po bezpośrednim sekwencjonowaniu utworzyły pięć kolejnych wzorców (V1, V2, V3, V4, V5). Przeprowadzone badania umożliwiły również wyciągnięcie wstępnych wniosków, iż genotyp szczepu *Y. enterocolitica* powiązany jest z gatunkiem zwierzęcia, od którego ten szczep wyizolowano. Dominującym genotypem wśród szczepów izolowanych od kaczek krzyżówek był genotyp G1, pośród izolatów od jeleni G2, a wśród szczepów izolowanych od dzików G3. Najbardziej zróżnicowanym gatunkiem okazały się sarny – izolaty pochodzące od tego gatunku należały do genotypów G1 i G4 (praca 5.2.2.2). Co ciekawe, wariacje stwierdzano tylko w przypadku szczepów izolowanych z tusz zwierząt łownych, przechowywanych w warunkach chłodniczych. Biorąc pod uwagę zdolność *Y. enterocolitica* do przeżywania i namnażania się w niskich temperaturach, może to świadczyć o zjawisku wymiany materiału genetycznego, przekładającego się na powstawanie nowych wariacji genu *ystB*, a niewykluczone, że i całego genomu. Badania dotyczące zastosowania techniki HRM do analizy szczepów *Y. enterocolitica* są niezwykle rzadkie, dotychczas opublikowano zaledwie kilka prac z tego zakresu. Wyniki badań własnych przedstawiono w następujących publikacjach:

5.2.2.1. **Banczerz-Kisiel A.\***, Lipczyńska K., Szczerba-Turek A., Gospodarek E., Platt-Samoraj A., Szweda W. (2014) The use of the HRM method for identifying possible mutations in the *ymoA* gene region and evaluating their influence on the enterotoxic properties of *Y. enterocolitica* strains. BMC Vet. Res. 10: 207-211. (MNiSW 40; IF 1,777)

5.2.2.2. **Banczerz-Kisiel A.\***, Szczerba-Turek A., Platt-Samoraj A., Michalczyk M., Szweda W. (2016) A study of single nucleotide polymorphism in the *ystB* gene of *Yersinia enterocolitica* strains isolated from various wild animal species. Ann. Agri. Environ. Med. In Press\*\* (MNiSW 20; IF 1,126)

\* autor korespondencyjny

\*\* zaświadczenie z Redakcji AAEM w załączniku

### 5.2.3. Badania nad wrażliwością szczepów *Y. enterocolitica* na antybiotyki

W trakcie pracy na stanowisku adiunkta uczestniczyłam w badaniach prowadzonych w Katedrze Epizootiologii, których tematyka dotyczyła różnych aspektów wrażliwości szczepów *Y. enterocolitica* na antybiotyki. Wykazano w nich, iż 103 szczepy *Y. enterocolitica* wyizolowane od trzody chlewnej w latach 2000 i 2007 charakteryzowały się zróżnicowaną wrażliwością na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe. Szczepy wykazywały w zdecydowanej większości silną wrażliwość na cefalosporyny III i IV generacji, natomiast oporność a na cefalosporyny I generacji i większość penicylin (praca 5.2.3.1). Duże zróżnicowanie zaobserwowano również we wrażliwości na inne grupy antybiotyków. Największą wrażliwość badanych szczepów zaobserwowano w przypadku chinolonów (cyprofloksacyna, norfloksacyna, enrofloksacyna), gentamycyny i kolistyny. Nieco mniejszą wrażliwość odnotowano w stosunku do chloramfenikolu; streptomycyna i neomycyna działały mało efektywnie, podobnie jak sulfonamidy i nitrofurantoina. Wszystkie badane szczepy *Y. enterocolitica* wykazywały oporność na tiamulinę (praca 5.2.3.2). Stwierdzono również, iż profil wrażliwości szczepów *Y. enterocolitica* wyizolowanych od świń w latach 2000 i 2007 uległ w tym okresie znaczącym zmianom, z zaznaczającą się tendencją narastania oporności na niektóre chemioterapeutyki stosowane w leczeniu weterynaryjnym (praca 5.2.3.3). Badania wykazały również pewne zróżnicowanie wrażliwości szczepów *Y. enterocolitica* na

chemioterapeutyki w zależności od biotypu i serotypu (praca 5.2.3.4). Efektem udziału w tych pracach badawczych jest współautorstwo w następujących publikacjach:

5.2.3.1. Perkowska K., Platt-Samoraj A., **Banczerz-Kisiel A.**, Szweda W. (2011) Susceptibility of Polish *Yersinia enterocolitica* strains isolated from pigs to 12  $\beta$ -lactam antibiotics. Bull. Vet. Inst. Pulawy 55: 397-402. (MNiSW 20; IF 0,414)

5.2.3.2. Perkowska K., Platt-Samoraj A., **Banczerz-Kisiel A.**, Szweda W. (2012) Antimicrobial susceptibility of *Yersinia enterocolitica* strains isolated from pigs in north-eastern region of Poland. Med. Weter. 68: 241-244. (MNiSW 10; IF 0,203)

5.2.3.3. Perkowska K., Platt-Samoraj A., **Banczerz-Kisiel A.**, Lipińska E., Piełudź D., Siemionek J., Szweda W. (2013) Ocena zmian wrażliwości na chemioterapeutyki szczepów *Yersinia enterocolitica* wyizolowanych od świń w Polsce w latach 2000 i 2007. Med. Weter. 69: 548-551. (MNiSW 15; IF 0,196)

5.2.3.4. Perkowska K., Platt-Samoraj A., **Banczerz-Kisiel A.**, Lipińska E., Piełudź D., Siemionek J., Szweda W. (2015) Wrażliwość szczepów *Yersinia enterocolitica* na chemioterapeutyki w zależności od biotypu i serotypu. Med. Weter. 71: 182-187. (MNiSW 15; IF 0,218)

#### **5.2.4. Badania nad wpływem eksperymentalnego zakażenia na długość siewstwa, poziom IgG oraz korelację poziomu przeciwciał z długością siewstwa *Y. enterocolitica***

Uczestniczyłam również w licznych doświadczeniach koncentrujących się na próbach immunizacji świń przeciwko zakażeniom *Y. enterocolitica*. W badaniach tych wykazano, iż podskórna immunizacja prosiąt eksperymentalną zawiesiną inaktywowanych szczepów *Y. enterocolitica* była skuteczniejsza przy zastosowaniu wyższej dawki, czyli 5 ml w odstępie 2 tygodni (praca 5.2.4.1). Reakcja immunologiczna w następstwie doustnego zakażenia zawiesiną *Y. enterocolitica* patogennego serotypu O:3 wystąpiła najszybciej i najsilniej w grupie kontrolnej – już w 1 tygodniu po zakażeniu. Siewstwo drobnoustrojów w 1 tygodniu po zakażeniu zanotowano u wszystkich zwierząt w grupie I i w grupie kontrolnej, natomiast w grupie II u 3 z 5 prosiąt. W kolejnych tygodniach po zakażeniu drobnoustroje izolowano jedynie w 2 tygodniu po zakażeniu w grupie I i grupie kontrolnej (praca 5.2.4.2). Reasumując,

zastosowana eksperymentalna immunizacja przeciw zakażeniu *Y. enterocolitica* nie zabezpieczyła zwierząt przed siewstwem drobnoustrojów, jedynie ograniczyła jego intensywność i czas trwania (praca 5.2.4.3). Efektem przeprowadzonych badań jest współautorstwo następujących publikacji poświęconych tej tematyce:

5.2.4.1. Platt-Samoraj A., Szweda W., Siwicki A.K., Procajło Z., Mikulska-Skupień E., **Banczerz-Kisiel A.**, Szczerba-Turek A. (2012) Effect of experimental immunization of pigs with a suspension of *Yersinia enterocolitica* selected strains on changes in serum immunoglobulin G levels. *Centr. Eur. J. Immunol.* 37: 96-101. (MNiSW 15; IF 0,378)

5.2.4.2. Platt-Samoraj A., Szweda W., Siwicki A.K., Procajło Z., Mikulska-Skupień E., **Banczerz-Kisiel A.**, Szczerba-Turek A., Syczyło K. (2013) Relationship between *Yersinia enterocolitica* antibody level and bacterial shedding after challenge in previously immunized pigs. *Centr. Eur. J. Immunol.* 38: 203-207. (MNiSW 15; IF 0,358)

5.2.4.3. Platt-Samoraj A., Szweda W., Procajło Z., Mikulska-Skupień E., **Banczerz-Kisiel A.**, Szczerba-Turek A., Syczyło K. (2013) Wpływ immunizacji świń zawieszoną wyselekcjonowanych szczepów *Yersinia enterocolitica* na przebieg doświadczalnego zakażenia oraz okres siewstwa drobnoustrojów. *Med. Weter.* 69: 543-547. (MNiSW 15; IF 0,196)

#### 5.2.5. Wykrywanie, analiza filogenetyczna oraz zastosowanie metody HRM do szybkiego różnicowania papillomawirusów izolowanych od koni

Brałam także udział w badaniach nad wirusami z rodziny *Papillomaviridae*, izolowanymi z końskich sarkoidów. Wykazano w nich występowanie fragmentu genu E5 bydłęcego papillomawirusa typu 1 (*Bovine papillomavirus* type 1 – BPV-1) w materiale archiwalnym pochodzącym z 14 bloczków parafinowych z sarkoidów koni, przebadanych histopatologicznie w latach 2001-2004 (praca 5.2.5.1). Analiza filogenetyczna genu E5 BPV wyizolowanego z 38 przypadków klinicznych potwierdziła, że w sarkoidach koni w Polsce identyfikowany jest BPV-1 (praca 5.2.5.2). Stosowano również technikę qPCR-HRM, opartą na identyfikacji polimorfizmu genu E5 BPV-1 i BPV-2 do szybkiej identyfikacji wirusa

występującego w sarkoidach koni (praca 5.2.5.3). Efektem udziału w badaniach nad występowaniem nowotworowych genów późnych L1, E2 i E5 w sarkoidach koni jest wykrycie 28 sekwencji nukleotydowych oraz 35 sekwencji białkowych umieszczonych w bazie NCBI oraz następujące publikacje:

5.2.5.1. Szczerba-Turek A., Siemionek J., Szweda W., **Banczerz-Kisiel A.**, Raś A., Rotkiewicz T. (2009) PCR detection and sequence variants of E5 ORFs bovine papillomavirus detected in formalin – fixed, paraffin – embedded (FFPE) tissues obtained from equine sarcoids. Bull. Vet. Inst. Pulawy 53: 563-567. (MNiSW 15; IF 0,218)

5.2.5.2. Szczerba-Turek A., Siemionek J., **Banczerz-Kisiel A.**, Raś A., Szweda W. (2011) Phylogenetic analysis of bovine papillomavirus E5 detected in equine sarcoids in Poland. Pol. J. Vet. Sci. 14: 653-654. (MNiSW 20; IF 0,565)

5.2.5.3. Szczerba-Turek A., **Banczerz-Kisiel A.**, Lipczyńska K., Siemionek J., Raś A., Platt-Samoraj A., Szweda W. (2014) Quantitative PCR High-Resolution Melting (qPCR-HRM) curve analysis, a new approach to rapid detection and differentiation of bovine papillomavirus detected in equine sarcoids. Pol. J. Vet. Sci. 17: 239-245. (MNiSW 20; IF 0,604)

#### 5.2.6. Pozostałe prace oryginalne

W ostatnim czasie brałam również udział w badaniach poświęconych wykrywaniu *Y. enterocolitica* u bobrów, efektem czego była izolacja pierwszych w Polsce szczepów *Y. enterocolitica* u tego gatunku zwierząt (praca 5.2.6.1). Ponadto, uczestniczę aktywnie w badaniach dotyczących diagnostyki molekularnej chorób pszczół (praca 5.2.6.2), wrażliwości na antybiotyki bakterii izolowanych od gołębi (praca 5.2.6.3), czy statystycznego opracowywania wzorów wykorzystywanych w badaniach ultrasonograficznych (praca 5.2.6.4). Efektem tych badań są następujące prace oryginalne:

5.2.6.1. Platt-Samoraj A., Syczyło K., **Banczerz-Kisiel A.**, Szczerba-Turek A., Giżejewska A., Szweda W. (2015) *Yersinia enterocolitica* strains isolated from beavers (*Castor fiber*). Pol. J. Vet. Sci. 18: 449-451. (MNiSW 20; IF 0,604)

5.2.6.2. Michalczyk M., Sokół R., Szczerba-Turek A., **Banczerz-Kisiel A.** (2011) A comparison of the effectiveness of the microscopic method and the multiplex PCR method in identifying and discriminating the species of *Nosema spp.* spores in worker bees (*Apis mellifera*) from winter hive debris. Pol. J. Vet. Sci. 14: 385-391. (MNiSW 20; IF 0,565)

5.2.6.3. Stenzel T., **Banczerz-Kisiel A.**, Tykałowski B., Śmiałek M., Pestka D., Koncicki A. (2014) Antimicrobial resistance in bacteria isolated from pigeons in Poland. Pol. J. Vet. Sci. 17: 169-171. (MNiSW 20; IF 0,604)

5.2.6.4. Socha P., Janowski T., **Banczerz-Kisiel A.** (2015) Ultrasonographic fetometry formulas of inner chorionic cavity diameter and biparietal diameter for medium-sized dogs can be used in giant breeds. Theriogenology 84: 779-783. (MNiSW 30; IF 1,798)

## 6. Zestawienie liczbowe dorobku naukowego (dotyczy tylko publikacji pełnotekstowych)

### 6.1. Zestawienie liczbowe dorobku naukowego uwzględniające rodzaj publikacji, listę MNiSW oraz współczynnik wpływu (IF)

Rodzaj publikacji	Liczba publikacji	Punktacja MNiSW	IF
Prace oryginalne w czasopismach z listy JCR (lista „A” MNiSW) (w tym wykorzystane w postępowaniu habilitacyjnym)	25 (4)	525 (120)	18,538 (6,664)
Prace oryginalne w czasopismach z listy „B” MNiSW (tj. czasopisma bez naliczonego IF)	-	-	-
Prace przeglądowe w czasopismach z listy JCR (lista „A” MNiSW) (w tym wykorzystane w postępowaniu habilitacyjnym)	1 (1)	20 (20)	1,126 (1,126)
Prace przeglądowe w czasopismach z listy „B” MNiSW (tj. czasopisma bez naliczonego IF)	3	31	-
<b>Łącznie</b>	<b>29</b>	<b>576</b>	<b>19,644</b>



## 6.2. Zestawienie liczbowe i procentowe dorobku naukowego w kontekście pierwszego (wyłączniego) autorstwa oraz współautorstwa

	Liczba publikacji		Punktacja MNiSW		IF	
	Suma	Odsetek	Suma	Odsetek	Suma	Odsetek
<b>Publikacje oryginalne*</b>						
Publikacje, których jestem pierwszym lub wyłącznym autorem	11	44%	275	52%	11.597	63%
Pozostałe publikacje	14	56%	250	48%	6.921	37%
<b>Publikacje przeglądowe**</b>						
Publikacje, których jestem pierwszym lub wyłącznym autorem	1	25%	20	39%	1.126	100%
Pozostałe publikacje	3	75%	31	61%	-	-
<b>Łącznie***</b>						
Publikacje, których jestem pierwszym lub wyłącznym autorem	12	41%	295	51%	12.723	65%
Pozostałe publikacje	17	59%	281	49%	6.921	35%

- Punktację MNiSW podano według komunikatu MNiSW obowiązującego dla roku publikacji.
- Współczynnik wpływu (IF) podano dla roku, w którym opublikowano pracę. Dla artykułów opublikowanych w latach 2015 i 2016 podano ostatni ustalony IF, tj. dla roku 2014.
- Wartość procentowa odnosi się do całkowitej wartości poszczególnych parametrów dotyczących albo artykułów oryginalnych\*, albo przeglądowych\*\*, bądź też wszystkich publikacji\*\*\*.

## 7. Pozostałe dane bibliograficzne

Liczba cytowań według Web of Science: **38**

Indeks Hirscha według Web of Science: **4**

W moim dorobku naukowym znajduje się również 16 doniesień konferencyjnych, z których w 9 jestem pierwszym autorem. Szczegółowe dane na ich temat znajdują się w Załączniku nr 3 dołączonym do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego. W powyższym załączniku znajduje się również wyszczególnienie 100 sekwencji nukleotydowych oraz 107 sekwencji białkowych, będących wzorami użytkowymi chronionymi prawem, umieszczonymi w GenBanku National Center for Biotechnology Information (NCBI), których jestem autorem lub współautorem. Parametry dorobku naukowego, udział w projektach krajowych i międzynarodowych, otrzymane nagrody oraz pozostałe osiągnięcia naukowe opisano szczegółowo w Załączniku nr 3 dołączonym do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego. Informacje o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki zamieszczono w Załączniku nr 4 dołączonym do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

29.02.2016 Agata Banczerz-Kisiel