

Załącznik 2

AUTOREFERAT

1. Imię i nazwisko

Joanna Mokracka

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania

Dyplom doktora nauk biologicznych w zakresie biologii uzyskany na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu w 1997 r. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Wirulencja bakterii *Aeromonas* spp. wyrażona produkcją sideroforów przez szczepy środowiskowe i wyizolowane z materiałów od chorych”.

Promotor: Prof. dr hab. Krystyna Włodarczak

Dyplom magistra biologii, specjalizacja biologia molekularna, uzyskany na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu w 1988 r. Tytuł pracy magisterskiej: „Porównanie własności biochemicznych mitochondriów izolowanych z liści i korzeni łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L.)”

Promotor: Prof. dr hab. Ryszard W. Schramm

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych

1998– obecnie Zakład Mikrobiologii na stanowisku adiunkta

1991–1997 Zakład Mikrobiologii UAM na stanowisku asystenta

1990–1991 Zakład Mikrobiologii UAM na stanowisku biologa

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.):

Tytuł osiągnięcia:

**Występowanie i struktura integronów oporności u wybranych szczepów
*Enterobacteriaceae***

Część badań prowadzona była w ramach projektu MNiSW nr N N304 080635, którego byłam kierownikiem.

a) (autorzy*, tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

1. **Mokracka J.**, Koczura R., Pawłowski K., Kaznowski A. 2011. Resistance patterns and integron cassette arrays of the *Enterobacter cloacae* complex strains of human origin. *Journal of Medical Microbiology*. 60, 737–743.
2. **Mokracka J.**, Koczura R., Jabłońska L., Kaznowski A. 2011. Phylogenetic groups, virulence genes and quinolone resistance of integron-bearing *Escherichia coli* strains isolated from a wastewater treatment plant. *Antonie van Leeuwenhoek*. 99, 817–824.
3. **Mokracka J.**, Koczura R., Kaznowski A. 2012. Multiresistant *Enterobacteriaceae* with class 1 and class 2 integrons in a municipal wastewater treatment plant. *Water Research*. 46, 3353–3363.
4. **Mokracka J.**, Gruszczyńska B., Kaznowski A. 2012. Integrons, β -lactamase and *qnr* genes in multidrug resistant clinical isolates of *Proteus* spp. *APMIS*. 120, 950–958.
5. **Mokracka J.**, Oszyńska A., Kaznowski A. 2012. Increased frequency of integrons and β -lactamase-coding genes among extraintestinal *Escherichia coli* isolated with a 7-year interval”. *Antonie van Leeuwenhoek*. DOI 10.1007/s10482-012-9797-9; opublikowany online 4 IX 2012 r.

*Oświadczenia współautorów prac wraz z określeniem indywidualnego wkładu każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w załączniku 8

b) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

(Informacje w nawiasach kwadratowych odnoszą się do publikacji zgodnie z numeracją podaną w Autoreferacie)

Celem badań, które prowadziłam było określenie występowania integronów, ich struktury, rodzaju przenoszonych kaset oporności oraz związku z wieloopornością wybranych rodzajów bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, izolowanych z materiałów od chorych ludzi i z próbek pobranych w oczyszczalni ścieków na różnych etapach procesu oczyszczania. Zadania obejmowały: identyfikację integronów w genomie izolatów, oznaczenie odsetka szczepów poszczególnych grup bakterii zawierających integrony wraz z profilami oporności, określenie przekazywalności integronów i oporności na drodze koniugacji, identyfikację kaset genowych na podstawie sekwencji nukleotydowych i określenie struktury części zmiennej integronu.

Najważniejsze wnioski wynikające z przeprowadzonych badań:

- Integrony oporności występują w genomach pałeczek rodziny *Enterobacteriaceae* z wysoką częstością (ok. 50%) u szczepów klinicznych (*Enterobacter* sp., *Proteus* sp., *Escherichia* sp.) i mniejszą (ok. 12%) u szczepów izolowanych ze ścieków miejskich (*Escherichia* sp., *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Serratia* sp., *Citrobacter* sp., *Pantoea* sp., i *Kluyvera* sp.).
- Obecność integronów klasy 1 w genomie bakterii związana jest ze zjawiskiem wielooporności – wszystkie szczepy z integronami, niezależnie od ich zawartości genowej, były odporne na co najmniej trzy chemioterapeutyki należące do różnych klas.
- W przypadku klinicznych szczepów *Enterobacteriaceae* występuje związek pomiędzy obecnością integronów, a zwiększoną częstością oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki zwłaszcza aminoglikozydy, chinolony, tetracykliny, sulfonamidy i trimetoprim.
- Integrony klinicznych szczepów *Enterobacter* sp., oraz środowiskowych *Escherichia* sp., *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Serratia* sp., i *Citrobacter* sp. przenoszone są w procesie koniugacji z częstością 10^{-4} – 10^{-5} , co wskazuje na możliwość ich rozprzestrzeniania się na drodze horyzontalnego transferu w populacjach bakterii.

- Oprócz oporności warunkowanej genami zawartymi w integronach, koniugacyjnie przenoszone mogą być pozaintegronowe geny determinujące oporność na β -laktamy, fenikole i tetracykliny.
- Występują różnice w liczbie i rodzaju genów integronów szczepów izolowanych z różnych szpitali oraz jednorodność typów kaset genowych u izolatów pochodzących z tego samego szpitala.
- Duża stabilność kaset genowych występująca w przypadku szczepów klinicznych związana jest prawdopodobnie z wysoką presją selekcyjną wywołaną stosowaniem antybiotyków. Przeważa tendencja do włączania kolejnych integronów do genomu, nad włączaniem kolejnych kaset do już istniejących struktur.
- Integrony klasy drugiej występują z niewielką częstością u klinicznych szczepów z rodzaju *Escherichia* brak ich u *Enterobacter* sp., natomiast są obecne u około połowy szczepów *Proteus* sp. We wszystkich genach *intI2* stwierdzono obecność kodonu stop w pozycji 179, czego efektem może być mniejsza różnorodność kaset w obrębie integronu.
- Integrony szczepów pochodzących z oczyszczalni ścieków charakteryzuje większa różnorodność kaset genowych, zarówno warunkujących oporność na antybiotyki, jak i obecność takich, które kodują białka mające prawdopodobnie znaczenie fizjologiczne oraz o nieznaną dotąd funkcję.
- Najczęściej identyfikowanymi kasetami, zarówno u szczepów klinicznych jak i wyizolowanych ze ścieków, były: *aadA*, warunkująca oporność na streptomycynę i spektynomycynę, oraz *dfrA* warunkująca oporność na trimetoprim.
- Obecność genów transpozaz, *tnp*, sekwencji insercyjnych, kaset kodujących białka hipotetyczne i o znaczeniu fizjologicznym, w obrębie integronów szczepów środowiskowych świadczy o wzmożonym procesie horyzontalnego transferu genów, który może być stymulowany subinhibicyjnymi stężeniami antybiotyków i dużą liczbą mikroorganizmów w oczyszczalni ścieków
- Przynależność do grup filogenetycznych wyizolowanych ze ścieków pałeczek *E. coli* zawierających integrony, była odmienna niż dotychczas obserwowana u izolatów pochodzących ze środowiska, od ludzi czy zwierząt; najwięcej szczepów (36,6%) należało do grupy D, z którą wiązane są izolaty wywołujące zakażenie jelitowe i pozajelitowe.
- Jednoczesna obecność integronów i genów wirulencji w obrębie mobilnych elementów genetycznych stwarza zagrożenie związane z rozprzestrzenianiem się wieloopornych i chorobotwórczych szczepów *E. coli* w środowisku.

Krótkie streszczenie prac przedstawiam poniżej.

Wystąpienie i rozprzestrzenianie oporności na antybiotyki wśród bakterii jest najbardziej uderzającym przykładem mikroewolucji, który jest obserwowany w świecie mikroorganizmów w ciągu ostatnich 60 lat. Rozprzestrzenianie się genów oporności na antybiotyki wśród szczepów klinicznych jest związane z obecnością ruchomych elementów genomu bakteryjnego: plazmidów i transpozonów. Jednakże dopiero badania ostatnich lat wykazały, że jednym z istotnych mechanizmów pojawienia się wielooporności i jej szerokiego rozprzestrzeniania odpowiedzialne są integrony, będące naturalnymi systemami nabywania fragmentów obcego DNA na drodze horyzontalnego transferu genów. Integron jest „platformą montażową”, która włącza egzogenne otwarte ramki odczytu w procesie miejscowo-specyficznego rekombinacji i konwertuje je w funkcjonalne geny przez zapewnienie im prawidłowej ekspresji. Wszystkie integrony opisane do tej pory składają się z trzech kluczowych elementów koniecznych do włączania egzogennych genów: genu *intI*, kodującego integrasę należącą do rodziny rekombinaz tyrozynowych, pierwszorzędowego miejsca rekombinacji *attI* i promotora P_C , który kieruje transkrypcją włączanych genów. Integrasa może rekombinować jednostki kolistego DNA, znane jako kasety genowe, na drodze niezależnej od RecA. Integracja następuje poniżej stałego promotora P_C w miejscu *attI*, umożliwiając ekspresję genu w kasecie.

Obecnie wyróżnia się pięć klas integronów, które odgrywają rolę w przenoszeniu genów oporności na antybiotyki. Klasy te wyróżnione były na podstawie podobieństwa sekwencji genów integrazy, które wykazują 40-58% identyczności. Wszystkie klasy integronów związane są z mobilnymi fragmentami DNA takimi jak transpozony i plazmidy koniugacyjne, które służą jako nośnik w wewnątrz- i międzygatunkowym transferze materiału genetycznego. Klasa 1 związana jest z funkcjonalnymi lub niefunkcjonalnymi transpozonami wywodzącymi się od *Tn402*, który może być zlokalizowany w obrębie większego transpozonu, takiego jak *Tn21*. Integrony klasy 2 związane są z *Tn7*, a integrony klasy 3 wydają się być częścią transpozonu na dotychczas nieokreślonym plazmidzie. Pozostałe dwie klasy integronów, 4 i 5, związane są z opornością na trimetoprim u szczepów *Vibrio* spp.

Badaniami objęłam bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* z rodzajów *Enterobacter*, *Proteus* i *Escherichia*, pochodzące z materiałów od chorych ludzi leczonych szpitalnie. W przypadku rodzaju *Enterobacter*, szczepy izolowano z materiałów od chorych ludzi ze szpitali z dwóch odległych od siebie miast; Poznania (szpital 1) i Kołobrzegu (szpital 2) [1]. Na podstawie analizy sekwencji genu *hsp60*, 87% szczepów zaliczono do gatunku *E.*

hormaechei, pozostałe do *E. cloacae* i *E. kobei*. Analiza ERIC-PCR wykazała, że szczepy należące do tego samego gatunku były genetycznie niespokrewnione. Analiza oporności izolatów na 15 antybiotyków należących do 8 klas, wykazała, że 87,95% szczepów było opornych na więcej niż dwa antybiotyki, 75,4% na więcej niż trzy antybiotyki należące do różnych klas. U 55,1% szczepów występowały integrony klasy 1, 17,4% izolatów miało dwa integrony tej klasy w genomie, nie stwierdziłam natomiast obecności genów integraz klasy 2 i 3. W moich badaniach podgatunkiem dominującym w zakażeniach wywołanych przez bakterie zaliczane do *E. cloacae* complex był *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii*. W genomach bakterii tego podgatunku stwierdziłam największą częstość występowania integronów (63,3%), ponadto jedynie w genomach tego gatunku zaobserwowałam większą liczbę integronów i integrony z największą częścią zmienną (1,9 kpb), a więc i największą liczbą wbudowanych kaset genowych. Wykazałam, że wielooporność pałeczek *E. cloacae* complex związana była z obecnością integronów. Obecność genu integrazy była związana ze zwiększoną częstością oporności na wszystkie, oprócz imipenemu, antybiotyki ($P < 0,01$). Analiza wielkości części zmiennej integronów wykazała obecność od jednej do trzech kaset genowych, zidentyfikowanych jako: *aadA* (*aadA1*, 2) kodujących adenylotransferazy aminoglikozydów warunkujące oporność na streptomycynę i spektynomycynę, *aadB*, kodującą transferazę (2^o) aminoglikozydów warunkującą oporność na amikacynę, gentamicynę, kanamycynę, tobramycynę, netilmycynę, sisomycynę i dibekacynę, *aacA4*, kodującą acetylotransferazę aminoglikozydów warunkującą oporność na amikacynę i tobramycynę, *dfr* (*dfrA1*, 12), kodujących reduktazy kwasu dihydrofoliowego warunkujące oporność na trimetoprim i *orfF* kodującą białko hipotetyczne o dotychczas nieznaną funkcję. Liczba kaset genowych i typów szeregów kaset w obrębie integronu była ograniczona. Ponadto zaobserwowano różnice ww. cech w zależności od szpitala, z którego pochodził szczep: szeregi *aadA1*, *dfrA1-aadA1*, *dfrA12-orfF-aadA2* zidentyfikowałam w szpitalu 1, natomiast *aadB-aadA2* i *dfrA12-orfF-aadA2* w szpitalu 2. Wykazałam, że wszystkie integrony badanych szczepów *E. cloacae* complex występowały w obrębie mobilnych elementów genetycznych. Częstość transferu wynosiła 10^{-4} – 10^{-5} , a przenoszone geny warunkowały oporność na aminoglikozydy, tikarcylinę, piperacylinę, sulfametoksazol, trimetoprim i tetracyklinę. Integrony klasy 1 bakterii *Enterobacter cloacae* complex wykazują stabilność struktury, przeważa tendencja do ich kumulacji w genomie nad włączaniem kolejnych kaset. Zróżnicowanie kaset genowych w obrębie każdego ze szpitali było ograniczone do pięciu (cztery kasety kodujące oporność na antybiotyki, jedna kodująca białko hipotetyczne). Występują natomiast różnice w zawartości genowej integronów pomiędzy

szczepami izolowanymi z różnych szpitali, co wskazuje na zachodzące na ich terenie niezależne procesy horyzontalnego transferu determinant oporności stymulowane wysoką presją selekcyjną wywołaną stosowaniem antybiotyków [1].

W kolejnych badaniach analizowałam częstość występowania i strukturę integronów 69 szczepów *E. coli* wyizolowanych z zakażeń pozajelitowych na przestrzeni 12 lat: 38 szczepów izolowano w latach 1999-2001 (grupa 1), 31 izolatów w latach 2008-2010 (grupa 2) [5]. W analizie metodą ERIC-PCR trzy pary izolatów miały identyczne profile; szczepy te jednak różniły się zawartością integronów i profilami oporności. Szczepy izolowane w latach 2008-2010 wykazywały znacząco większe spektrum oporności definiowane zarówno jako liczba chemioterapeutyków, jak i liczba klas chemioterapeutyków, na które szczep był oporny. Szczepy grupy 2 były odporne na 4 do 28 (mediana 22) chemioterapeutyków należących do 4-10 klas (mediana 9), izolaty I grupy były odporne na 1 do 22 chemioterapeutyków (mediana 7) należących do 1-9 klas (mediana 4). Obecność genów integrazy stwierdziłam u 53,6% szczepów: 52,2% miało *intI1*, 1,4%- *intI2*, jeden izolat (1,4%) miał zarówno *intI1* i *intI2*. Odnotowałam znaczący wzrost liczby szczepów z integronami z 31,6% (grupa I) do 80,7% (grupa 2). Obecność genu integrazy była związana ze zwiększoną częstością oporności na wszystkie stosowane antybiotyki oprócz imipenemu, piperacyliny z tazobaktamem i ceftazydymu ($P < 0,05$). Produkty amplifikacji regionu zmiennego integronu klasy 1 miały wielkość od 0,55 do 3,0 kpz: 0,55 kpz (1 izolat), 0,7 kpz (4), 1,0 kpz (5), 1,6 kpz (7), 1,7 kpz (6), 1,9 kpz (11), i 3,0 kpz (1). Dwa szczepy miały po dwa integrony: 1,0 i 1,7 kpz, oraz 1,6 i 3,0 kpz. Integrony klasy 2 miały część zmienną wielkości 2,2 kpz. W integronach klasy 1 szczepów grupy 1 stwierdziłam tylko trzy szeregi kaset *aadA1* (1,0 kpz), *dfrA1-aadA1* (1,6 kpz) i *dfrA17-aadA5* (1,7 kpz). W grupie 2 szczepów odnotowałam występowanie więcej niż jednego integronu w genomie, obecność integronów klasy 2, większą różnorodność kaset genowych, oraz więcej kaset w obrębie części zmiennej. W integronach klasy 1 szczepów należących do grupy 2 wyróżniłam sześć różnych szeregów kaset mianowicie: *dfr2d* (0,55 kpz), *aadA1* (1,0 kpz), *dfrA1-aadA1* (1,6 kpz), *dfrA17-aadA5* (1,7 kpz), i *aacA4-aacA1-orfX-orfY-aadA1* (3,0 kpz) i kasety kodujące białka hipotetyczne (0,7 kpz), ponadto integrony klasy 2 z szeregiem *dfrA1-sat2-aadA1* (2,2 kpz). Obecność integronów związana była z wieloopornością, fenotypem ESBL i występowaniem genów kodujących β -laktamazy o rozszerzonym spektrum ($P < 0,001$). Zaobserwowałam znaczący wzrost częstości fenotypu ESBL (od 21,1% do 93,5%) i częstości genu *bla_{CTX-M}* z jego wariantem *bla_{CTX-M-15}* oraz obecność genów kodujących cefalosporynazy typu AmpC takie

jak CMY-15 i DHA. Dodatkowo określiłam otoczenie genetyczne genów *bla*_{CTX-M} i stwierdziłam występowanie *ISEcp1*, który poprzedzał *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-3} i *bla*_{CTX-M-15}, co może wzmacniać ekspresję genów *bla*_{CTX-M} oraz ułatwiać ich transpozycję i rozprzestrzenianie się w obrębie populacji. Zaobserwowałam wystąpienie szczepów opornych na kilkanaście klas chemioterapeutyków, zawierających w genomach integrony oraz geny kodujące β-laktamazy o rozszerzonym spektrum i cefalosporynazy.

Występowanie integronów określiłam również dla 35 izolatów *Proteus* sp.: *P. mirabilis* (33) i *P. vulgaris* (2) [4]. Szczepy wyizolowano z materiałów pochodzących od pacjentów szpitala w latach 2010-2011. Do badań wybrano izolaty oporne na co najmniej dwa antybiotyki należące do różnych klas. W analizie ERIC-PCR dwa szczepy *P. mirabilis* miały identyczne wzory amplikonów, jednak różniły się profilami oporności na antybiotyki oraz liczbą i klasą integronów. Szczepy *P. mirabilis* były oporne na 5 do 26 antybiotyków należących do 9 grup. Wszystkie były wielooporne, trzy wytwarzały β-laktamazy typu ESBL, 57,1% było opornych na więcej niż 20 chemioterapeutyków należących do 8 i więcej klas. Najczęściej występowała oporność na trimetoprim (97,1%), streptomycynę (94,3%) i tetracyklinę (91,4%); najniższą częstość odnotowano dla meropenemu (11,4%). W genomach 69,7% izolatów *P. mirabilis* stwierdziłam obecność genów integrazy: 18,2% *intI1*, 33,3% *intI2* i 18,2% zarówno *intI1* i *intI2*. W genomie jednego szczepu *P. vulgaris* stwierdziłam *intI1* i *intI2*. Obecność genu integrazy była związana ze zwiększoną częstością oporności na gentamicynę, ciprofloksacynę, sulfametoksazol i kotrimoksazol ($P < 0,05$) i zwiększonym zakresem oporności szczepu, wyrażanym jako liczba chemioterapeutyków i liczba klas chemioterapeutyków (odpowiednio, $P = 0,009$ i $P = 0,003$). Szczepy mające geny integrazy były oporne średnio na 17 antybiotyków należących do 8 klas, a niemające genu *intI* na 11 antybiotyków należących do 7 klas. Produkty amplifikacji regionu zmiennego integronu klasy 1 miały wielkość od 1,0 do 3,0 kpz: 1,0 kpz (5 szczepów), 1,5 kpz (1), 1,6 kpz (2), 2,1 kpz (1) i 3,0 kpz (3), a klasy 2 miały wielkość 2,2 kpz (18 izolatów). Zidentyfikowałam następujące szeregi kaset w integronach klasy 1: *aadA1* (1,0 kpz), *aadB-aadA2* (1,5 kpz), *dfrA1-aadA1* (1,6 kpz), *bla*_{PSE-1}-*aadA2* (2,1 kpz) and *aacA4-orfA-orfB-aadA1* (3,0 kpz) i klasy 2 *dfrA1-sat2-aadA1* (2,2 kpz). Większość kaset genowych zawartych w integronach koduje oporność na aminoglikozydy i trimetoprim. Występowanie integronów u szczepów *P. mirabilis* jest raczej markerem wielooporności niż jej uwarunkowaniem [4].

W związku z wysoką częstością oporności na β-laktamy i fluorochinolony oznaczyłam występowanie genów kodujących cefalosporynazy AmpC i związanych z plazmidami genów

oporności na chinolony (PMQR - plasmid-mediated quinolone resistance). Oporność na fluorochinolony jest determinowana przede wszystkim mutacjami w genach kodujących gyrazę i topoisomerazę IV lub w genach regulujących ekspresję pomp błonowych usuwających leki z komórek (ang. efflux pumps). Rosnąca oporność na tę grupę antybiotyków jest coraz częściej jednak wiązana z genami *qnr*, *qepA*, i *aac(6')-Ib-cr*, obecnymi w plazmidach. Białka Qnr uniemożliwiają wiązanie chinolonów do gyrazy, *qepA* koduje białko systemu transportu chinolonów, a *aac(6')-Ib-cr* acetyltransferazę aminoglikozydów, zmniejszającą aktywność ciprofloksacyny. Geny PMQR jak i geny kodujące cefalosporynazy AmpC mogą być częścią tzw. złożonych integronów (ang. complex integron), które oprócz części zmiennej zawartej pomiędzy regionem 5' i 3' mają dodatkowe geny oporności, region *ISCR1* i zduplikowany fragment 3'. W genomach badanych izolatów stwierdzono, potwierdzoną sekwencjonowaniem, obecność genów: *bla_{CMY-15}*, *bla_{DHA-1}*, *qnrS1* (1 izolat *P. mirabilis*) i *qnrD* (9 izolatów *P. mirabilis* i 1 *P. vulgaris*). Częściowe sekwencje *qnrD* szczepów *P. mirabilis* i *P. vulgaris* zostały zdeponowane w bazie GenBank (numery odpowiednio JQ070958.1 i JQ177060.1), gdyż jest to pierwsze doniesienie stwierdzające występowanie *qnrD* u *P. vulgaris* w Europie i jedno z pierwszych dotyczących ww. genu u *P. mirabilis*. Występowanie genów PMQR i kodujących cefalosporynazy nie było jednak związane z obecnością integronów [4].

Dla porównania, jak również w celu określenia dróg rozprzestrzeniania się genów oporności w środowisku, zebrałam szczepy (1832) wyizolowane ze ścieków na trzech etapach procesu oczyszczania [3]. Izolaty poddane zostały wstępnej analizie, która wykazała, że u 12,1% występują integrony oporności: u 11,3% należące do klasy 1, u 1,0% do klasy 2 (w tym 0,3% miało integrony obu klas). Nie stwierdziłam obecności genu integrazy klasy trzeciej. Wśród szczepów zawierających integrony 7,2% miało więcej niż jeden w genomie. Szczepy identyfikowane były za pomocą testów API 20E i należały przede wszystkim do rodziny *Enterobacteriaceae* (*Escherichia* sp., *Klebsiella* sp., *Citrobacter* sp. *Serratia* sp., *Kluyvera* sp. *Pantoea* sp. i *Morganella morganii*). Szczepy z integronami występowały na wszystkich etapach procesu oczyszczania ścieków: 22,5% w ścieku surowym, 4,9% w komorze napowietrzania i 9,1% w ścieku oczyszczonym. Nie stwierdziłam obecności szczepów tego samego gatunku będących klonami. Wszystkie szczepy zawierające integrony były wielooporne, a więc odporne na co najmniej trzy antybiotyki należące do różnych klas. Największy odsetek szczepów opornych zanotowałam dla streptomycyny (97,7%), sulfametoksazolu (96,4%) i ampicyliny (91,9%), najmniejszy – dla imipenemu (1,8%),

ceftazydymu (8,6%) i netylmycyny (13,6%). Zakres oporności szczepów na antybiotyki nie wykazywał statystycznie istotnych różnic między drobnoustrojami izolowanymi z poszczególnych etapów oczyszczania. Niemniej jednak, stwierdziłam statystycznie istotne różnice w częstości występowania szczepów opornych na 12 z 27 leków ($P < 0,05$). Częstość ta wzrastała w kolejnych etapach oczyszczania dla 9 preparatów (netylmycyny, piperacyliny z tazobaktamem, amoksycyliny z klawulaniumem, ceftazydymu, cefalotyny, cefoperazonu, cefazoliny, cefuroksymu i chloramfenikolu). Dla trzech antybiotyków (trimetoprimu, norfloksacyny i tetracykliny) stwierdzono zjawisko odwrotne [3].

W analizie części zmiennej integronów klasy 1 metodą PCR uzyskałam amplikony o wielkości od 0,18 do 3,0 kpz. Nie stwierdziłam zależności wielkości części zmiennej integronu od etapu oczyszczania, z którego izolowany był szczep. Integrony klasy 1 zawierały ponad 30 różnych kaset genowych, przy czym większość z nich kodowała enzymy warunkujące oporność na antybiotyki i chemioterapeutyki:

- adenylotransferazy aminoglikozydów, geny *aadA* (*aadA1*, 2, 5, 15), warunkujące oporność na streptomycynę i spektynomycynę,
- transferazę (2^{''}) aminoglikozydów, gen *aadB*, warunkującą oporność na amikacynę, gentamicynę, kanamycynę, tobramycynę, netilmycynę, sisomycynę i dibekacynę,
- acetylotransferazy aminoglikozydów, gen *aacA* (*aacA4* i 7), warunkujące oporność na amikacynę i tobramycynę,
- reduktazy kwasu dihydrofoliowego, geny *dfr* (*dfrA1*, 7, 12, 17, *dfrB3*), warunkujące oporność na trimetoprim,
- β -laktamazy, geny *bla* (*bla*_{GES5}, *bla*_{OXA1}, *bla*_{OXA2}, *bla*_{OXA10}, *bla*_{OXA30}), warunkujące oporność na antybiotyki β -laktamowe,
- acetylotransferazy chloramfenikolu, geny *catB8*, warunkujące oporność na chloramfenikol,
- acetylotransferazę streptotrycyny, *sat2*, warunkującą oporność na streptotrycynę,
- esterazę, gen *estX*, niewyjaśniona rola w oporności,

Pozostałe kasety zidentyfikowałam jako: *orfF* i *orfD* kodujące białka hipotetyczne o dotychczas nieznannej funkcji, *smt r-* gen kodujący maturazę, co może świadczyć o udziale intronu grupy II-*IIattC* w procesie tworzenia się kaset genowych, geny kodujące białko periplazmatyczne, permeazy z rodziny MFS (major facilitator superfamily), gen *psp* kodujący fosfatazę fosfoserynową, geny kodujące integralne białka błonowe, kinazy i białka transdukcji sygnału [3].

Najczęściej identyfikowanymi kasetami były *aadA1* (57,1%), *dfrA1* (25,8%) i *dfrA17* (13,1%), najczęściej występującymi szeregami kaset w obrębie integronów; *dfrA1-aadA1* (20,4%), *aadA1* (14%), *dfrA17-aadA1* (12,7%) i *dfrA12-orfF-aadA2* (5,4%). Największa różnorodność kaset występowała u *E. coli*, najmniejsza u *Pantoea* sp. Zaobserwowano znaczący wzrost częstości występowania kasety *aacA4* w oczyszczonym ścieku w porównaniu ze ściekiem surowym, a także zmniejszenie częstości *aadA5* i *dfrA17* w komorze napowietrzania w porównaniu ze ściekiem surowym.

Integrony klasy 2 stwierdziłam u 19 szczepów. Analiza sekwencji fragmentu genu *intI2*, we wszystkich przypadkach ujawniła obecność kodonu stop w pozycji 179 genu, czego efektem jest synteza нефunkcjonalnego białka i mniejsza różnorodność kaset w obrębie integronu. Mimo tego, wiadomo jest, że integrację kaset do integronu klasy 2 może prowadzić integraza klasy 1 lub jakakolwiek inna obecna w komórce. Prawdopodobnie ze względu na obecność mutacji nonsensownej zidentyfikowałam jedynie trzy rodzaje kaset (*sat2*, *aadA1*, *dfrA1*) i dwa rodzaje szeregów genów: *sat2-aadA1*, *dfrA1-sat2-aadA1*.

Dla szczepów *E. coli* zawierających integrony oznaczyłam przynależność do grup filogenetycznych oraz obecność najistotniejszych genów kodujących czynniki wirulencji typowe dla patotypów wywołujących zakażenia jelitowe i pozajelitowe [2]. Badania dotyczące klinicznych szczepów *E. coli* wykazały związek pomiędzy opornością na chemioterapeutyki i zmniejszoną częstością czynników wirulencji, sugerując jednocześnie, że oporność, zwłaszcza na chinolony, może być związana z utratą zjadliwości w dotychczas niewyjaśnionym mechanizmie. Interesującym było więc zagadnienie związane z częstością występowania genów wirulencji u wieloopornych szczepów z integronami. Przynależność do grup filogenetycznych pałeczek *E. coli* zawierających integrony była odmienna niż dotychczas zaobserwowana u izolatów pochodzących ze środowiska czy też od ludzi. Najwięcej szczepów (36,6%) należało do grupy D, z którą wiązane są izolaty wywołujące zakażenia jelitowe i pozajelitowe. Najmniejszy udział miały szczepy z grupy B2 (13,8%), z której wywodzą się patogeny pozajelitowe, jednakże odsetek ten był większy niż u szczepów zawierających integrony i pochodzących od zdrowych ludzi. Stwierdzono występowanie genów następujących czynników wirulencji: toksyny ciepłostajłej ST (34% badanych szczepów), toksyny Shiga (16%), intyminy (6%), jersiniobakteryjnego systemu pozyskiwania żelaza (28%), aerobakteryjnego systemu pozyskiwania żelaza (45%), fimbrii P (17%), fimbrii S (16%), fimbrii F1C (9%) oraz cytotoksycznego czynnika nekrotycznego (5%). Największy odsetek genów wirulencji stwierdzono u szczepów z grup B2 i D. Stwierdziłam, że

występowanie integronów u *E. coli* może być związane z przynależnością do grupy filogenetycznej. Oporność na chinolony i fluorochinolony odnotowałam odpowiednio, dla 56,0% i 50,4% szczepów, nie była ona jednak związana z liczbą genów wirulencji. Odsetek genów wirulencji określających patotypy jelitowe jak i pozajelitowe był mniejszy niż u szczepów izolowanych z zakażeń. Stwierdziłam jednak, że 17,4% szczepów z integronami miało trzy i więcej genów wirulencji, a obecność potencjalnie mobilnych integronów łącznie z przekazywalnymi, w większości przypadków, genami wirulencji stwarza zagrożenie związane z rozprzestrzenianiem się wieloopornych i chorobotwórczych szczepów *E. coli* [2].

Bakterie zawierające integrony występują w ściekach na wszystkich etapach oczyszczania tym również w ścieku oczyszczonym. Obecność integronu w genomie bakterii jest markerem wielooporności – wszystkie szczepy z integronami były odporne na co najmniej trzy antybiotyki należące do różnych klas. Oczyszczanie ścieków nie eliminuje szczepów opornych. Jakkolwiek nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w spektrum oporności bakterii wyizolowanych ze ścieku surowego, komory napowietrzania i kanału wypływowego, dla siedmiu antybiotyków odsetek izolatów opornych w ścieku oczyszczonym wzrósł ($P < 0,05$), co oznacza kumulację w ścieku oczyszczonym szczepów opornych przynajmniej na niektóre antybiotyki. W integronach szczepów pochodzących z oczyszczalni występują różne kasety genowe, również takie, które kodują białka mające prawdopodobnie znaczenie fizjologiczne jak i o nieznaną dotąd funkcję. Obecność integronów w obrębie mobilnych fragmentów genomu bakteryjnego stwarza zagrożenie związane z rozprzestrzenianiem się i gromadzeniem genów oporności na skutek ich horyzontalnego transferu zarówno w obrębie oczyszczalni jak i w wodzie rzeki, do której dopływają oczyszczone ścieki. W konsekwencji może stanowić to zagrożenie dla zdrowia publicznego. Obecność genów kodujących transpozazy, sekwencji insercyjnych, kaset kodujących białka hipotetyczne i o znaczeniu fizjologicznym w obrębie integronów szczepów środowiskowych świadczyć może o zachodzących procesach horyzontalnego transferu genów, co w oczyszczalni ścieków jest prawdopodobne ze względu na subinhibicyjne stężenie antybiotyków oraz dużą liczbę bakterii [3].

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo–badawczych

Studia ukończyłam w 1988 r. uzyskując magisterium z biologii ze specjalnością biologia molekularna. Prace magisterską wykonałam w Zakładzie Metabolizmu Węgla i Azotu pod kierownictwem prof. dr. hab. Ryszarda Schramma.

W Zakładzie Mikrobiologii UAM zatrudniona zostałam 1 sierpnia 1990 r. na stanowisku biologa. Od 1 kwietnia 1991 r. rozpoczęłam pracę na etacie asystenta. Moja praca badawcza koncentrowała się na badaniach związanych z wirulencją bakterii z rodziny *Vibrionaceae* i *Aeromonadaceae*. Badania dotyczyły przede wszystkim systemów pozyskiwania żelaza przez te drobnoustroje, w szczególności poprzez wytwarzanie niskocząsteczkowych chelatorów żelaza – sideroforów [zał.4, II K, postery 2,3]. Dnia 6 grudnia 1997 r. obroniłam pracę doktorską pt. „Wirulencja bakterii *Aeromonas* spp. wyrażona produkcją sideroforów przez szczepy środowiskowe i wyizolowane z materiałów od chorych”. Praca ta została wyróżniona, ja natomiast od 1 stycznia 1998 r. rozpoczęłam pracę na stanowisku adiunkta w Zakładzie Mikrobiologii. Część wyników pracy doktorskiej została opublikowana w dwóch artykułach [6, 7].

W pierwszym okresie pracy na tym stanowisku (1998-2003) kontynuowałam badania dotyczące zdolności bakterii do wytwarzania sideroforów. Metody hodowli szczepów, odżelaziania podłoża mikrobiologicznych, chemicznego oznaczania chelatorów żelaza i biologicznego oznaczania innych systemów pozyskiwania tego pierwiastka dostosowałam do badań szerszej grupy bakterii chorobotwórczych, zarówno Gram-ujemnych (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp.) jak i Gram-dodatnich (*Staphylococcus* sp.) [zał. 4, II K, postery 6,7]. Niektóre siderofory mogą być kodowane przez geny znajdujące się w obrębie ruchomych elementów genetycznych tzw. wysp patogenności. Efektem zainteresowań wyspami patogenności była praca przeglądowa opublikowana w Postępach Mikrobiologii i rozdział w monografii [8, 22]. Badanie organizacji wysp patogenności, zwłaszcza tych związanych z sideroforowymi systemami pozyskiwania żelaza, stanowiło kolejny etap mojej pracy. Wyspy patogenności są fragmentami DNA, które ze względu na obecność genu integrazy, zachowują potencjalną możliwość przenoszenia się na drodze horyzontalnego transferu genów w obrębie gatunku, rodzaju, czy nawet rodziny. Szczególnie interesowało mnie występowanie i charakterystyka wyspy wysokiej patogenności – HPI, pierwotnie wykrytej u chorobotwórczych szczepów *Yersinia* spp., u szczepów innych rodzajów, wyosobnionych z materiałów od chorych. W obrębie HPI występują geny kodujące system biosyntezy i transportu jersiniobaktyny – sideroforu będącego czynnikiem wirulencji bakterii *Yersinia* spp. Badaniami objęłam 107 szczepów należących do rodzajów *Enterobacter* i *Citrobacter*. Po określeniu chemicznej klasy chelatorów żelaza, oznaczeniu rodzaju sideroforów w testach biologicznych typu cross-feeding, oznaczyłam obecność genów będących integralną częścią HPI. Stwierdziłam ich występowanie u szczepów bakterii

Enterobacter cloacae, *E. sakazakii*, i *Citrobacter koseri*. Jako pierwsi odkryliśmy występowanie HPI u bakterii *E. aerogenes* (*Klebsiella mobilis*), jak również jako pierwsi określiliśmy strukturę HPI u *C. koseri*. Stwierdziłam również, że wyspa HPI u badanych szczepów jest funkcjonalna, czyli szczepy produkują siderofor - jersiniobaktynę, mimo iż badania struktury genetycznej HPI nie potwierdziły obecności wszystkich regionów wyspy. Wyniki opublikowano w dwóch pracach [9, 10]. Interesującym zagadnieniem było również wytwarzanie sideroforów i możliwość ich wymienialności między szczepami biorącymi udział w zakażeniach mieszanych. Zbadałam 137 szczepów *Enterobacteriaceae* i pałeczek niefermentujących wyizolowanych z 67 przypadków zakażeń mieszanych. W 53,7% zakażeń, szczepy wyizolowane z danego przypadku, wytwarzały takie same siderofory, co wpływa na wzrost stężenia sideroforu w miejscu infekcji i tym samym może zwiększać potencjał chorobotwórczy bakterii, jako, że stężenie chelatora żelaza wydaje się być bezpośrednio związane ze zjadliwością szczepu [zał. 4, II K, poster 10]. W przypadku, kiedy szczepy wytwarzały inne siderofory możliwość ich wymienialności stwierdziłam tylko przypadku 3 par: mianowicie szczepy *Pseudomonas aeruginosa* korzystały z enterobaktyny produkowanej przez szczepy *E. coli*, wyizolowane z tego samego przypadku zakażenia [16]. W przypadku 20% szczepów stwierdziłam wytwarzanie jersiniobaktyny, co stanowiło wstęp do dalszego etapu badań dotyczących występowania i struktury HPI u szczepów *E. coli* i *K. pneumoniae* izolowanych z zakażeń mieszanych, w celu stwierdzenia czy możliwy jest horyzontalny transfer potencjalnie mobilnej HPI pomiędzy szczepami biorącymi udział w tym samym zakażeniu. W przypadku jednej pary stwierdzono występowanie HPI u obu izolatów bakterii, jednakże wyspa miała odmienną strukturę: u szczepu *K. pneumoniae* nie uzyskano produktu amplifikacji regionu *ybtS-ybtX-ybtQ* [20].

Od 2003 prowadziłam prace związane z identyfikacją genu kodującego wytwarzanie amonabaktyny – sideroforu będącego czynnikiem zjadliwości pałeczek *Aeromonas* sp. Zaprojektowałam nową metodę wykrywania genu *amoA* w chromosomie bakterii z użyciem amplifikacji DNA techniką PCR. Kolejny etap mojej pracy to mutageneza genu *amoA*, prowadząca do konstrukcji szczepu indykatorowego do wykrywania amonabaktyny w testach biologicznych typu cross-feeding. Zbadanie kilkudziesięciu szczepów referencyjnych i wyizolowanych z materiałów od chorych bakterii z rodzaju *Aeromonas* wykazało w większości przypadków zależność pomiędzy przynależnością do gatunku, a typem wydzielanego sideroforu [zał. 4, II K, postery 9,11].

Równoległe z badaniami dotyczącymi sideroforowych systemów pozyskiwania żelaza i wysp patogenności zajmowałam się inną tematyką. W latach 2003-05 brałam udział w badaniach finansowanych z międzyuczelnianego grantu UAM i Akademii Rolniczej w Poznaniu, dotyczących wpływu probiotyków na florę bakteryjną jelita środkowego pszczoły miodnej. Badania te wykazały, że bakterie zawarte w probiotykach kolonizują jelito środkowe pszczoł, wpływając na zwiększenie suchej masy i poziomu tłuszczów w ciele owadów, a także przyczyniają się do lepszej przeżywalności pszczoł [12]. W latach 2005-2006 w ramach współpracy z Zakładem Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt uczestniczyłam w badaniach dotyczących peptydów antybiotycznych ze skóry żaby *Rana ridibunda*. Ich efektem były prace prezentowane podczas VIII Ogólnopolskiej Konferencji Herpetologicznej [zał. 4, II K, postery 12,13]. W latach 2002-2004 brałam udział w pracach Centrum Badań nad Terroryzmem UAM, czego wynikiem była praca przeglądowa opublikowana w Postęпах Mikrobiologii [11] oraz doniesienie na konferencji międzynarodowej [zał. 4, II K, poster 8].

Od roku 2006 wprowadziłam i zaczęłam rozwijać tematykę naukową dotyczącą oporności bakterii związanej z występowaniem integronów. Prace prowadziłam i prowadzę na szczepach izolowanych od chorych ludzi, należących do rodzajów: *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Escherichia* i innych pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*, jak również *P. aeruginosa*. Opracowałam wyniki dotyczące występowania, struktury i zawartości genowej integronów u wszystkich ww. izolatów, ich związku z profilem oporności badanych szczepów i obecnością innych genów warunkujących oporność, zwłaszcza tych, które są częścią potencjalnie mobilnych fragmentów genomu a mogą być również częścią integronów typu *sul* (geny *PMQR*, geny *bla*), lub mogą być mobilizowane przez sekwencje insercyjnej np. *ISEcp1*, *ISCR1*. Przeprowadziłam również oznaczenia dotyczące możliwości i częstości transferu integronów, oraz analizę plazmidową ww. szczepów. Część wyników przedstawiono na XXVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów (Szczecin 2008), a prezentowana praca zdobyła I miejsce w sesji „Antybiotyki i oporność” [zał. 4, II K, poster 15]. Część wyników dotyczących ww. rodzajów bakteryjnych jest prezentowana w ramach osiągnięcia naukowego. Prace dotyczące rodzaju *Klebsiella*, *Serratia* i *Pseudomonas* są bądź opublikowane [15], bądź przygotowywane są do druku.

Dodatkowym elementem badań nad integronami są analizy dotyczące związku między obecnością integronów i istotnych genów determinujących oporność, a przynależnością do grupy filogenetycznej i potencjałem chorobotwórczym *E. coli* (obecność genów wirulencji). Ustaliłam, że w przypadku szczepów izolowanych od chorych występowanie integronów

związane jest z przynależnością do grupy filogenetycznej i z występowaniem niektórych genów wirulencji: *usp*, *traT*, *papA*, *cnf1*, i *PAI*. Szczepy *E. coli* należały do grup filogenetycznych: B2 (60%), D (20%), A (15,4%) i B1 (4,6%) - geny integrazy najczęściej występowały wśród szczepów grupy filogenetycznej A, najrzadziej w B2 ($P < 0,05$). Najczęściej identyfikowanymi genami wirulencji były geny kodujące: jersiniobakteryjny system pozyskiwania żelaza (78%), białko OmpT (74%) i KpsMT (75%). Obecność integronów u szczepów *E. coli* związana była z występowaniem niektórych genów wirulencji: *usp*, *traT*, *papA*, *cnf1* i *PAI* ($P < 0,05$). Największy odsetek genów wirulencji stwierdzono w genomach szczepów grupy B2 ($P < 0,05$) [zał. 4, II K, poster 31].

W roku 2008 uzyskałam grant MNiSW (nr N N304 080635, okres realizacji 2008-2010) pt. „Występowanie i struktura integronów zawierających geny oporności u pałeczek *Enterobacteriaceae* pochodzących ze ścieków miejskich”. W ramach projektu zbadaliśmy ok. 2000 szczepów należących do rodziny *Enterobacteriaceae*. Efektem analizy dużej liczby izolatów środowiskowych i izolowanych od chorych jest propozycja, aby integrony uznać za markery wielooporności („Integrans as potential multiresistance markers in *Enterobacteriaceae*” X Jubilee Conference on Molecular Biology in Diagnostics of Infectious Diseases and Biotechnology, Warszawa, 2009; praca wyróżniona za najlepszą prezentację) [zał. 4, II K, poster 21]. Publikacje dotyczące szczepów *Enterobacteriaceae* są częścią osiągnięcia naukowego.

Kontynuuję badania dotyczące szczepów z integronami, wyizolowanych z oczyszczalni ścieków należących do rodziny *Aeromonadaceae*. Częstość występowania integronów u bakterii z rodziny *Aeromonadaceae* wynosiła 30%, czyli znacząco więcej niż u *Enterobacteriaceae*. Szczepy z integronami (173) izolowano ze wszystkich punktów poboru. Wielkość części zmiennych integronów wynosiła od 0,18 do 7,0 kbp, co może wskazywać na obecność od 0 do aż 7 kaset genowych. Trzydzieści cztery szczepy (19,6%) miało tzw. „zerowy” integron, bez wbudowanych kaset genowych. Spośród 173 izolatów, 98% było wieloopornych, czyli opornych na co najmniej trzy antybiotyki należące do różnych klas. Największy odsetek szczepów opornych obserwowano w przypadku sulfametoksazolu (96,9%), a najniższy w przypadku amikacyny (3,9%). W przypadku 172 szczepów zidentyfikowano gen integrazy klasy 1, jeden szczep miał geny *intI1* i *intI2*, nie stwierdzono obecności integrazy klasy 3 [zał. 4, II K, postery 18,27].

Równocześnie uczestniczyłam w badaniach szczepów środowiskowych pochodzących z Warty, prowadzonych w ramach grantu MNiSW nr N N305 035337 (2009-2012)

„Występowanie integronów - markerów wielooporności - u bakterii z grupy coli pochodzących z wody rzeki Warty”. Określiliśmy wpływ zrzutu ścieków oczyszczonych z miejskiej oczyszczalni na antybiotykooporność izolatów *E. coli* izolowanych z rzeki Warty. U szczepów izolowanych z rzeki poniżej punktu dopływu oczyszczonych ścieków wzrastała częstość występowania oporności na niektóre terapeutyki. Zwiększał się także zakres oporności bakterii, wyrażony zarówno liczbą antybiotyków, jak też liczbą klas antybiotyków, na które bakterie były odporne [19]. Ponadto wykazaliśmy związek pomiędzy występowaniem integronów klasy 1, a zwiększonym potencjałem chorobotwórczym pałeczek *E. coli* występujących w wodzie rzecznej. Obecność integronów związana była ze zwiększoną częstością genów warunkujących wytwarzanie takich czynników wirulencji jak: enterotoksyna ciepłostąła, jersiniobakteryjowy system pozyskiwania żelaza, aerobakteryjowy system pozyskiwania żelaza i fimbrie typu S, a także ze zwiększoną średnią liczbą genów wirulencji u poszczególnych szczepów [21].

Kontynuuję badania dotyczące obecności integronów i genów determinujących oporność na antybiotyki w metagenomie wodnym w ramach grantu NCN nr DEC-2011/03/B/NZ9/00070, 2012-2015 „Geny oporności na antybiotyki w wodach powierzchniowych”, którego jestem głównym wykonawcą.

Prowadziłam również badania dotyczące występowania integronów oporności w środowisku gdzie prawdopodobnie brak jest presji selekcyjnej wywołanej stosowaniem antybiotyków. Stwierdziliśmy mianowicie zwiększoną częstość występowania integronów klasy 2 u bakterii flory jelitowej dzika żyjącego w strefie buforowej Drawieńskiego Parku Narodowego, co świadczy o możliwości pojawienia się wieloopornych szczepów chorobotwórczych u dziko żyjących zwierząt [17]. Prowadzę również dalsze badania dotyczące identyfikacji integronów i genów oporności u bakterii Gram-ujemnych izolowanych od psów.

W latach 2007-2010 brałam udział w pracach zespołu dotyczących III systemu sekrecyjnego u *E. cloacae* i *Aeromonas* sp. System ten pozwala chorobotwórczym bakteriom wprowadzać wydzielane białka efektorowe wprost do cytoplazmy, a jego obecność jest markerem wirulencji. Zespół, w którego pracach brałam udział, jako pierwszy stwierdził występowanie trzeciego systemu sekrecji u *Enterobacter cloacae* [13], przeprowadził genetyczną analizę taksonomiczną i klonalną ww. izolatów [14], potwierdził obecność III systemu sekrecyjnego i wpływ na cytotoksyczność szczepów *Aeromonas* spp. [18].

Spis publikacji składających się na pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze:

6. Krzywińska S., **Mokracka J.**, Łaganowska M., Włodarczak K., Guszczńska E., Liszkowska J., Popkowska E., Lima I., Lemańska I., Wendt M. 2001. Enhancement of the virulence of *Aeromonas caviae* diarrhoeal strains by serial passages in mice. *Journal of Medical Microbiology*. 50, 303–312.
7. **Mokracka J.**, Krzywińska S., Szczuka E. 2001. Virulence factors of clinical isolates of *Aeromonas caviae*. *Folia Microbiologica*. 46, 321–326.
8. **Mokracka J.**, Koczura R., Kaznowski A. 2002. Wyspy patogenności. *Postępy Mikrobiologii*. 41, 51–69.
9. **Mokracka J.**, Kaznowski A., Szarata M., Kaczmarek E. 2003. Siderophore-mediated strategies of iron acquisition by extraintestinal isolates of *Enterobacter* spp. *Acta Microbiologica Polonica*. 52, 81–86.
10. **Mokracka J.**, Koczura R., Kaznowski A. 2004. Yersiniabactin and other siderophores produced by clinical isolates of *Enterobacter* spp. and *Citrobacter* spp. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 40, 51–55.
11. Kaznowski A., **Mokracka J.**, Koczura R. 2003. Zadania laboratoriów mikrobiologicznych w przypadku ataku bioterrorystycznego. *Postępy Mikrobiologii*. 42, 319–343
12. Kaznowski A., Szymaś B., Jaździńska E., Kazmierczak M., Paetz H., **Mokracka J.** 2005. The effects of food probiotic supplementation on the content of intestinal microflora and chemical composition of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Apicultural Research*. 44, 10–14.
13. Krzywińska S., **Mokracka J.**, R. Koczura R., Kaznowski A. 2009. Cytotoxic activity of *Enterobacter cloacae* human isolates. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 56, 248–252.
14. Krzywińska S., Koczura R., **Mokracka J.**, Puton T., Kaznowski A. 2010. Isolates of the *Enterobacter cloacae* complex induce apoptosis of human intestinal epithelial cells. *Microbial Pathogenesis* 49, 83–89.
15. Koczura R., **Mokracka J.**, Krzywińska S., Kaznowski A. 2011. Virulence properties and integron-associated antibiotic resistance of *Klebsiella mobilis* strains isolated from clinical specimens. *Journal of Medical Microbiology*. 60, 281–288.

16. **Mokracka J.**, Cichoszewska E., Kaznowski A. 2011. Siderophore production by Gram-negative rods isolated from polymicrobial infections. *Biological Letters*. 2, 147–157.
17. **Mokracka J.**, Koczura R., Kaznowski A. 2012. Transferable integrons of Gram-negative bacteria isolated from the gut of a wild boar in the buffer zone of a national park. *Annals of Microbiology*. 62, 877–880.
18. Krzywińska S., **Mokracka J.**, Koczura R., Ćwiertnia A., Kaznowski A. 2012. *Aeromonas* spp.-mediated cell-contact cytotoxicity is associated with the presence of type III secretion system. *Antonie van Leeuwenhoek*. 101, 243–251.
19. Koczura R., **Mokracka J.**, Jabłońska L., Gozdecka E., Kubek M, Kaznowski A. 2012. Antimicrobial resistance of integron-harboring *Escherichia coli* isolates from clinical samples, wastewater treatment plant and river water. *Science of the Total Environment*. 414, 680–685.
20. Koczura R., **Mokracka J.**, Kaznowski A. 2012. The *Yersinia* high-pathogenicity island in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from polymicrobial infections. *Polish Journal of Microbiology*. 61 71–73.
21. Koczura R., **Mokracka J.**, Barczak A., Krysiak N., Kaznowski A. 2012. Association between the presence of class 1 integrons, virulence genes and phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolates from river water. *Microbial Ecology*. DOI: 10.1007/s00248-012-0101-3; opublikowany online 19 VIII 2012 r.
22. **Mokracka J.** Pathogenicity islands and the evolution of microorganisms. 2005. W: Prus-Głowacki W., Pawlaczyk E.M. Variability and evolution. Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań.

Sumaryczny Impact Factor wszystkich publikacji wg listy Journal Citation Report, zgodnie z rokiem opublikowania: **35,102**

Suma punktów MNiSW **456** (wg punktacji z 2012 r.)

Jolanna Mokracka