



Załącznik 3a

---

**Autoreferat przedstawiający opis dorobku  
i osiągnięć naukowych w języku polskim**



## AUTOREFERAT

### 1. Imię i nazwisko

TOMASZ JAGIELSKI

### 2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

Stopień DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH (*summa cum laude*) nadany uchwałą Rady Naukowej Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie dn. 15 kwietnia 2010 r.

Tytuł pracy: Molekularna analiza epidemiologiczna szczepów *Mycobacterium tuberculosis* o wielolekooporności typu MDR, wyizolowanych od chorych na gruźlicę w Polsce w 2004 r.

Promotor pracy: Prof. dr hab. Zofia Zwolska

Recenzenci: Prof. dr hab. Jarosław Dziadek  
Prof. dr hab. Kazimierz Roszkowski-Śliż

Tytuł MAGISTRA BIOTECHNOLOGII w zakresie MIKROBIOLOGII (*summa cum laude*) uzyskany na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego dn. 5 sierpnia 2005 r.

Tytuł pracy: Klonowanie genów kodujących istotne determinanty patogenyzy *Listeria monocytogenes* do szczepu *Bacillus subtilis*

Opiekun pracy: Prof. dr hab. Jacek Bielecki

Tytuł LICENCJATA BIOTECHNOLOGII w zakresie MIKROBIOLOGII (*summa cum laude*) uzyskany na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego dn. 15 lipca 2003 r.

Tytuł pracy: Oczyszczanie hemolizyny *Listeria monocytogenes* metodą chromatografii powinowactwa i jej wstępna charakterystyka

Opiekun pracy: Prof. dr hab. Jacek Bielecki

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

Od 2010                      Adiunkt w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej Instytutu Mikrobiologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego

2005 – 2010                Studia doktoranckie w Zakładzie Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie

**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. 2017 r. poz. 1789)**

a) **Tytuł osiągnięcia naukowego**

**Charakterystyka chorobotwórczych glonów z rodzaju *Prototheca* – aspekty epidemiologiczne, diagnostyczne i terapeutyczne**

b) **Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, ze szczególnym omówieniem indywidualnego wkładu wnioskodawcy<sup>1</sup>**

- i. Anjos, C., Sabino, C., Celidonio Pogliani, F., Sellera, F., Ribeiro, M., Lincopan, N., Gargano, R., **Jagielski, T.** Algicidal effect of blue light on pathogenic *Prototheca* species. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, **2019**, **26**, 210-213.

IF<sub>2017</sub><sup>2</sup> = **2,895**; IF<sub>5-letni</sub> = **2,796**; pkt MNiSW<sup>3</sup> = **25**; liczba cytowań (Web of Science) = **0**.

Wkład habilitanta: **20%**. Współautorstwo koncepcji badań i planu wszystkich doświadczeń; udostępnienie szczepów referencyjnych *Prototheca* spp. do badań; współautorstwo manuskryptu publikacji; współudział w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- ii. **Jagielski, T.**, Roeske, K., Bakuła, Z., Piech, T., Wlazło, Ł., Bochniarz, M., Woch, P., Krukowski, H. A survey on the incidence of *Prototheca* mastitis in dairy herds in Lublin province, Poland. *J. Dairy Sci.*, **2019**, **102**(1), 619-628.

IF<sub>2017</sub> = **2,749**; IF<sub>5-letni</sub> = **3,085**; pkt MNiSW = **45**; liczba cytowań (Web of Science) = **0**.

Wkład habilitanta: **55%**. Autor korespondencyjny. Autorstwo koncepcji badań; projekt i nadzór nad wszystkimi doświadczeniami; autorstwo wszystkich procedur eksperymentalnych i zbiorczych arkuszy wynikowych; udział we wstępnej (parametryzacyjnej/optymalizacyjnej) fazie wszystkich doświadczeń laboratoryjnych; udział w części badań terenowych; analiza i interpretacja wyników badań (wsp. z dr K. Roeske); autorstwo manuskryptu; przygotowanie wszystkich rycin i tabel; opracowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- iii. **Jagielski, T.**, Krukowski, H., Bochniarz, M., Piech, T., Roeske, K., Bakuła, Z., Wlazło, Ł., Woch, P. Prevalence of *Prototheca* spp. on dairy farms in Poland – a cross-country study. *Microb. Biotechnol.*, **2019**, **12**(3), 556-566.

IF<sub>2017</sub> = **3,913**; IF<sub>5-letni</sub> = **4,243**; pkt MNiSW = **35**; liczba cytowań (Web of Science) = **0**.

<sup>1</sup> W porządku chronologicznym.

<sup>2</sup> Zgodnie z rokiem publikacji; w wypadku prac opublikowanych w latach 2018 i 2019 zastosowano ostatnią, dostępną w bazach wartość współczynnika, tj. za rok 2017 (IF<sub>2017</sub>).

<sup>3</sup> MNiSW, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Wkład habilitanta: **55%**. Autor korespondencyjny. Autorstwo koncepcji badań; projekt i nadzór nad wszystkimi doświadczeniami; autorstwo wszystkich procedur eksperymentalnych i zbiorczych arkuszy wynikowych; udział we wstępnej (parametryzacyjnej/optymalizacyjnej) fazie wszystkich doświadczeń laboratoryjnych; udział w części badań terenowych; analiza i interpretacja wyników badań (wsp. z dr K. Roeske); autorstwo manuskryptu; przygotowanie wszystkich rycin i tabel; opracowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- iv. **Jagielski, T.**, Gawor, J., Bakuła, Z., Decewicz, P., Maciszewski, K., Karnkowska, A. *cytb* as a new genetic marker for differentiation of *Prototheca* species. *J. Clin. Microbiol.*, **2018**, **56**(10), pii:e00584-18.

IF<sub>2017</sub> = **4,054**; IF<sub>5-letni</sub> = **3,962**; pkt MNiSW = **35**; liczba cytowań (Web of Science) = **2**.

Wkład habilitanta: **55%**. Autor korespondencyjny. Autorstwo koncepcji badań; projekt i nadzór nad wszystkimi doświadczeniami; udział we wstępnej (parametryzacyjnej/optymalizacyjnej) fazie wszystkich doświadczeń laboratoryjnych; analiza i interpretacja wyników badań; autorstwo manuskryptu; przygotowanie lub korekta wszystkich rycin i tabel; opracowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- v. **Jagielski, T.**, Bakuła, Z., Pleń, M., Kamiński, M., Nowakowska, J., Bielecki, J., Wolska, K.I., Grudniak, A.M. The activity of silver nanoparticles against microalgae of the *Prototheca* genus. *Nanomedicine*, **2018**, **13**(9), 1025-1036.

IF<sub>2017</sub> = **5,005**; IF<sub>5-letni</sub> = **5,519**; pkt MNiSW = **40**; liczba cytowań (Web of Science) = **0**.

Wkład habilitanta: **55%**. Autor korespondencyjny. Współautorstwo (z dr A. Grudniak) koncepcji badań; projekt i nadzór nad wszystkimi doświadczeniami; udział we wstępnej (parametryzacyjnej/optymalizacyjnej) fazie wszystkich doświadczeń laboratoryjnych; analiza i interpretacja wyników badań; autorstwo manuskryptu; przygotowanie wszystkich rycin i tabel; opracowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów; opieka naukowa nad studentką studiów magisterskich (M. Pleń).

- vi. **Jagielski, T.**, Niedźwiecka, K., Roeske, K., Dyląg, M. 3-bromopyruvate as an alternative option for the treatment of protothecosis. *Front. Pharmacol.*, **2018**, **9**, e375.

IF<sub>2017</sub> = **3,831**; IF<sub>5-letni</sub> = **4,439**; pkt MNiSW = **40**; liczba cytowań (Web of Science) = **1**.

Wkład habilitanta: **45%**. Autor korespondencyjny. Współautorstwo (z dr. M. Dylągiem) koncepcji badań, projektu wszystkich doświadczeń, analiz ich wyników oraz manuskryptu publikacji (wraz z redakcją odpowiedzi na uwagi recenzentów); współudział (z dr. M. Dylągiem) w wykonaniu oznaczeń MIC i MAC 3-bromopirogronianiu (3-BP) i amfoterycyny B (AMB) dla wszystkich badanych szczepów oraz testów interakcji międzyplekowej (3-BP vs AMB vs 3-BP+AMB).

- vii. **Jagielski, T.**, Gawor, J., Bakuła, Z., Zuchniewicz, K., Żak, I., Gromadka, R. An optimized method for high-quality DNA extraction from microalga *Prototheca wickerhamii* for genome sequencing. *Plant Meth.*, **2017**, **13**, e77.

IF<sub>2017</sub> = **4,269**; IF<sub>5-letni</sub> = **4,502**; pkt MNiSW = **40**; liczba cytowań (Web of Science) = **3**.

Wkład habilitanta: **40%**. **Autor korespondencyjny**. Współautorstwo (z mgr. J. Gaworem i dr. R. Gromadką) koncepcji badań i projektu wszystkich doświadczeń; kompleksowa analiza wyników; autorstwo manuskryptu publikacji (dzielone w zakresie opisu materiałów i metod oraz części wyników z mgr. J. Gaworem, dr Z. Bakułą i dr. R. Gromadką); opracowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- viii. **Jagielski, T.**, Bakuła, Z., Di Mauro, S., Casciari, C., Cambiotti, V., Krukowski, H., Turchetti, B., Ricchi, M., Manuali, E., Buzzini, P. A comparative study of the *in vitro* activity of iodopropynyl 1 butylcarbamate (IPBC) and amphotericin B (AMB) against *Prototheca* spp. *J. Dairy Sci.*, **2017**, **100**(9), 7435-7445.

IF<sub>2017</sub> = **2,749**; IF<sub>5-letni</sub> = **3,085**; pkt MNiSW = **45**; liczba cytowań (Web of Science) = **3**.

Wkład habilitanta: **45%**. **Autor korespondencyjny**. Autorstwo koncepcji badań; projekt wszystkich doświadczeń i udział w przygotowawczej ich fazie (parametryzacyjnej/optymalizacyjnej); określenie (wraz z dr Z. Bakułą) wartości MIC / MAC amfoterycyny B oraz 3-jodo-2-propynylo-N-butylokarbaminianu dla wszystkich ( $n=138$ ) szczepów *Prototheca* spp. objętych badaniem; kompleksowa analiza i interpretacja wyników; autorstwo manuskryptu publikacji; przygotowanie wszystkich rycin i tabel; opracowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów; opieka naukowa nad studentką studiów magisterskich (S. Di Mauro).

- ix. **Jagielski, T.**, Dyląg, M., Roesler, U., Murugaiyan, J. Isolation of infectious microalga *Prototheca wickerhamii* from a carp (*Cyprinus carpio*) – a first confirmed case report of protothecosis in a fish. *J. Fish Dis.*, **2017**, **40**(10), 1417-1421.

IF<sub>2017</sub> = **2,004**; IF<sub>5-letni</sub> = **2,057**; pkt MNiSW = **35**; liczba cytowań (Web of Science) = **2**.

Wkład habilitanta: **60%**. **Autor korespondencyjny**. Autorstwo koncepcji badań i projekt wszystkich analiz; oznaczenie szczepu metodami molekularnym (PCR-sequencing); opracowanie wyników; autorstwo manuskryptu publikacji; przygotowanie wszystkich rycin; opracowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- x. Alves, A. C., Capra, E., Morandi, S., Cremonesi, P., Pantoja, J. C., Langoni, H., de Vargas, A. P., da Costa, M. M., **Jagielski, T.**, Bolaños, C. A., Guerra, S. T., Ribeiro, M. G. *In vitro* algicidal effect of guanidine on *Prototheca zopfii* genotype 2 strains isolated from clinical and subclinical bovine mastitis. *Lett. Appl. Microbiol.*, **2017**, **64**(6), 419-423.

IF<sub>2017</sub> = **1,471**; IF<sub>5-letni</sub> = **1,848**; pkt MNiSW = **25**; liczba cytowań (Web of Science) = **3**.

Wkład habilitanta: **20%**. Współautorstwo koncepcji badań i planu wszystkich doświadczeń; udostępnienie szczepów referencyjnych *Prototheca* spp. do badań;

współautorstwo manuskryptu publikacji; współudział w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- xi. Żak, I., **Jagielski, T.**, Kwiatkowski, S., Bielecki, J. *Prototheca wickerhamii* as a cause of neuroinfection in a child with congenital hydrocephalus. First case of human protothecosis in Poland. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **2012**, **74**(2), 186-189.

IF<sub>2012</sub> = **2,260**; IF<sub>5-letni</sub> = **2,342**; pkt MNiSW = **25**; liczba cytowań (Web of Science) = **10**.

Wkład habilitanta: **50%**. Autor korespondencyjny. Autorstwo koncepcji badań i wszystkich analiz; oznaczenie szczepu metodami molekularnymi (PCR-sequencing); opracowanie wyników; autorstwo manuskryptu publikacji; wykonanie i opracowanie 3/4 ilustracji; opracowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- xii. **Jagielski, T.**, Buzzini, P., Lassa, H., Malinowski, E., Branda, E., Turchetti, B., Polleichtner, A., Roesler, U., Lagneau, P.-E., Marques, S., Silva, E., Thompson, G., Stachowiak, R., Bielecki, J. Multicenter E-test evaluation of *in vitro* susceptibility of *Prototheca* sp. isolates towards antifungal drugs. *J. Antimicrob. Chemother.*, **2012**, **67**(8), 1945-1947.

IF<sub>2012</sub> = **5,338**; IF<sub>5-letni</sub> = **5,173**; pkt MNiSW = **40**; liczba cytowań (Web of Science) = **11**.

Wkład habilitanta: **35%**. Autor korespondencyjny. Organizacja konsorcjum badawczego; autorstwo koncepcji badań, procedurek eksperymentalnych i zbiorczych arkuszy wynikowych; analiza i interpretacja wyników badań; współautorstwo manuskryptu publikacji; opracowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- xiii. Ahrholdt, J., Murugaiyan, J., Straubinger, R. K., **Jagielski, T.**, Roesler, U. Epidemiological analysis of worldwide bovine, canine and human clinical *Prototheca* isolates by PCR genotyping and MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping. *Med. Mycol.*, **2011**, **50**(3), 234-243.

IF<sub>2011</sub> = **2,457**; IF<sub>5-letni</sub> = **2,687**; pkt MNiSW = **35**; liczba cytowań (Web of Science) = **19**.

Wkład habilitanta: **20%**. Współautorstwo koncepcji badań i planu doświadczeń; typowanie genetyczne szczepów *Prototheca* spp. wyizolowanych w Polsce (wsp. z dr J. Ahrholdt); udział w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

- xiv. **Jagielski, T.**, Lassa, H., Ahrholdt, J., Malinowski, E., Roesler, U. Genotyping of bovine *Prototheca* mastitis isolates from Poland. *Vet. Microbiol.*, **2011**, **149**(1-2), 283-287.

IF<sub>2011</sub> = **3,327**; IF<sub>5-letni</sub> = **2,770**; pkt MNiSW = **40**; liczba cytowań (Web of Science) = **39**.

Wkład habilitanta: **65%**. Autorstwo koncepcji badań i projekt wszystkich doświadczeń; wykonanie wszystkich doświadczeń laboratoryjnych (w części dotyczącej genotypowania szczepów *Prototheca* spp. – wsp. z dr J. Ahrholdt); kompleksowe opracowanie wyników; autorstwo manuskryptu publikacji; przygotowanie wszystkich tabel i rycin; opracowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- xv. Lassa, H., **Jagielski, T.**, Malinowski, E. Effect of different heat treatments and disinfectants on the survival of *Prototheca zopfii*. *Mycopathologia*, **2011**, **171**(3), 177-182.

IF<sub>2010</sub> = **1,654**; IF<sub>5-letni</sub> = **1,641**; pkt MNiSW = **20**; liczba cytowań (Web of Science) = **12**.

Wkład habilitanta: **20%**. Współautorstwo koncepcji badań i planu doświadczeń; współautorstwo manuskryptu publikacji.

- xvi. **Jagielski, T.**, Lassa, H., Ahrholdt, J., Roesler, U., Malinowski, E. Molecular characterization of Polish *Prototheca zopfii* mastitis isolates and first isolation of *Prototheca blaschkeae* in Poland. *Pol. J. Vet. Sci.*, **2010**, **13**(4), 725-729.

IF<sub>2010</sub> = **0,507**; IF<sub>5-letni</sub> = **0,839**; pkt MNiSW = **20**; liczba cytowań (Web of Science) = **7**.

Wkład habilitanta: **65%**. Autor korespondencyjny. Autorstwo koncepcji badań i projekt wszystkich doświadczeń; wykonanie wszystkich doświadczeń laboratoryjnych (w części dotyczącej genotypowania szczepów *Prototheca* spp. – wsp. z dr J. Ahrholdt); kompleksowe opracowanie wyników; autorstwo manuskryptu publikacji; przygotowanie wszystkich tabel i rycin; opracowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- ❖ Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w których ukazały się publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego<sup>4</sup> – **48,483**
- ❖ Sumaryczna liczba punktów MNiSW – **545**
- ❖ Liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, na dzień 15.04.2019 r. (wg Web of Science) – **112**

c) **Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

## WPROWADZENIE

Do rodzaju *Prototheca* należą jednokomórkowe, pozbawione chlorofilu glony, szeroko rozpowszechnione w przyrodzie. Izoluje się je m.in. z naturalnych i sztucznych zbiorników wodnych, wody kanalizacyjnej, ścieków, odchodów zwierzęcych, materiału roślinnego i wielu produktów żywnościowych [1]. Drobnoustroje te po raz pierwszy wyhodowali Zopf i Kühn w 1880 roku z wycieków przyranych lipy (*Tillia* sp.), ale pełną charakterystykę rodzaju podał Krüger w 1894 roku [2]. Od tamtego czasu, problem przynależności taksonomicznej tych organizmów był przedmiotem wielu kontrowersji. Początkowo rozpoznane, na podstawie cech morfologicznych, jako grzyby drożdżopodobne, zostały następnie zaliczone do glonów ze względu na taki sam sposób rozmnażania jak u przedstawicieli *Chlorella* spp. Klasyfikację tę utrzymano wraz z wynikami badań filogenetycznych, wskazującymi na bliski związek pokrewieństwa między prototekami

<sup>4</sup> Zgodnie z rokiem publikacji; w wypadku prac opublikowanych w latach 2018 i 2019 zastosowano ostatnią, dostępną w bazach wartość współczynnika, tj. za rok 2017 (IF<sub>2017</sub>).



a zielonymi glonami *Auxenochlorella protothecoides*. Obecnie, rodzaj *Prototheca* sytuje się w rzędzie Chlorellales klasy Trebouxiophyceae i zawiera 8 gatunków: *P. wickerhamii*, *P. zopfii*, *P. blaschkeae*, *P. stagnora*, *P. ulmea*, *P. cutis*, *P. miyajii* oraz *P. tumulicola* [2-9]. Ponadto, w obrębie gatunku *P. zopfii* wyróżnia się dwa typy genetyczne (1 i 2) [5]. Z kolei dla gatunku *P. blaschkeae* opisano podgatunek *P. blaschkeae* subsp. *brasiliensis* [9]. Mimo że glony z rodzaju *Prototheca* są wolnożyjącymi saprofitami, mogą w określonych warunkach, zwykle dysfunkcji układu odpornościowego, wywoływać choroby u ludzi i zwierząt (tzw. prototekozy). Spośród opisanych gatunków, *P. wickerhamii*, *P. zopfii*, *P. blaschkeae*, *P. cutis* oraz *P. miyajii* uznaje się za patogenne dla człowieka i zwierząt. Potencjał chorobotwórczy glonów opisywano już wcześniej, choćby ich zdolność produkcji toksyn wywołujących zatrucia biegunkowe, paralityczne, neurotyczne i amnezyczne. Jednak zdolność wywoływania zakażeń jest niezwykle rzadka zarówno wśród glonów, jak i roślin. Spośród szacowanej liczby ok. 400 000 gatunków roślin występujących na świecie [10], tylko bezbarwne glony *Prototheca* spp. i zielone glony *Chlorella* spp. zdolne są do aktywnego parazytyzmu wobec zwierząt kręgowych, w tym człowieka.<sup>5</sup> O ile jednak przypadki chlorellozy notuje się sporadycznie, w rozproszonych geograficznie stanowiskach, prototekozą ma zasięg globalny, a częstość jej wystąpień, zarówno wśród zwierząt, jak i ludzi, od kilku dekad ma wyraźny trend zwykły. Tym samym, prototekozą należy do tzw. nowo pojawiających się chorób zakaźnych (ang. *emerging infectious diseases*), o rozmaitej etiologii – bakteryjnej, grzybiczej i pierwotniaczej, które razem stanowią coraz poważniejszy problem dla zdrowia publicznego.

Prototekozę u ludzi wywołują *P. wickerhamii* i, rzadziej, *P. zopfii*.<sup>6</sup> Choroba najczęściej przyjmuje postać skórną, stawową, o obrazie zapalenia wyrostka łokciowego (*olecranon bursitis*), lub uogólnioną, zwykle u osób z silną immunosupresją, u których zakażenie może obejmować różne narządy wewnętrzne (m.in. wątrobę, otrzewną, płuca, opony mózgowo-rdzeniowe) [18,19]. Przegląd piśmiennictwa kazuistycznego jasno pokazuje istotny wzrost liczby zachorowań. Jeżeli w okresie 30 lat od 1964 roku (1964-1996), kiedy opisano pierwszy przypadek prototekozy u człowieka, odnotowano łącznie 75 nowych przypadków, to już w okresie ostatniego 20-lecia (1997-2017), liczba nowych przypadków wyniosła 135 [20].<sup>7</sup> Ten znaczący wzrost zachorowań należy przypisać z jednej strony powiększającej się populacji osób z obniżoną odpornością (skutkiem starzenia, a także chorób i zabiegów wymagających leczenia immunosupresyjnego), z drugiej zaś – większej świadomości klinicznej i osiągnięciom technologicznym w diagnostyce laboratoryjnej.

U zwierząt, zakażenia wywołwane są głównie przez *P. zopfii*, *P. blaschkeae* oraz *P. wickerhamii*. Dotyczą najczęściej bydła, choć opisano je także u psów [21], kotów [22,23], kóz [24,25], bobra [26], jelenia [27], nietoperza [28], koni [29] i ryb [30,31].

Najczęstszą postacią zwierzęcej prototekozy jest zapalenie gruczołu mlekowego (*mastitis*) krów.<sup>8</sup> Glony *Prototheca* spp. poszerzają bakteryjną i drożdżakową etiologię zapalenia

<sup>5</sup> Zakażenia glonami *Chlorella* spp. opisano u kilkunastu zwierząt, głównie krów i owiec [11,12]. Dotychczas odnotowano tylko dwa przypadki chlorellozy u człowieka [13,14]. Wśród glonów wywołujących zakażenia u bezkręgowców, najlepiej poznane są zielone glony z gatunku *Coccomyxa parasitica* i bezbarwne glony z gatunku *Helicosporidium parasiticum*, patogeny, odpowiednio małży i stawonogów (gł. owadów) [15-17].

<sup>6</sup> Pojedyncze przypadki prototekozy u człowieka odnotowano w wyniku zakażenia *P. blaschkeae* [5], *P. cutis* [6] oraz *P. miyajii* [7].

<sup>7</sup> Na podstawie własnego przeglądu literatury, liczbę przypadków prototekozy u ludzi w okresie 1964-2017 obliczyłem na 252 [Jagielski, T., dane niepublikowane].

<sup>8</sup> Głównym czynnikiem etiologicznym prototekowego *mastitis* jest *P. zopfii* gen. 2. Znacznie rzadziej, źródłem zakażeń jest *P. blaschkeae*. Zakażenie z udziałem *P. zopfii* gen. 1 wywołano jedynie drogą eksperymentalnej inokulacji (wszczepienia dowymieniowego) [32].

wymienia i przyczyniają się do istotnych strat ekonomicznych w hodowlach krów wysokomlecznych, szacowanych na 35 mld USD rocznie [33]. Pierwszy przypadek *mastitis* u krów opisano w Niemczech w 1952 roku [34]. Wkrótce potem, podobne przypadki zaczęto notować na całym świecie, przy czym ich liczba w kolejnych latach istotnie się zwiększała [35]. W Polsce, zakażenie prototekowe u krów opisano po raz pierwszy w 2002 roku [36]. Od tego czasu, glony *Prototheca* spp. izoluje się stale w różnych rejonach kraju i w różnych liczbach [37]. Przy tym, większość doniesień ma charakter lokalny i zwykle pozbawiona jest wątku dochodzeń epidemiologicznych czy szerszego kontekstu środowiskowego. Brak jak dotąd kompleksowego, przekrojowego badania poświęconego prototekozie bydła w Polsce.

Zapalenie gruczołu mlekowego wywoływane przez algi *Prototheca* spp. ma najczęściej przebieg chroniczny, przy braku objawów klinicznych lub obrazie skąpoobjawowym. Choroba charakteryzuje się progresywnymi zmianami w tkance gruczołowej wymienia, skutkując drastycznym spadkiem wydajności mlecznej i istotnym obniżeniem jego jakości [35,38]. Cechą znamioną zakażeń prototekowych jest wyjątkowo niska skuteczność leczenia. Glony *Prototheca* spp. wykazują wysoką oporność<sup>A</sup> na większość stosowanych w praktyce weterynaryjnej środków terapeutycznych, włączając antybiotyki, fungistatyki i środki dezynfekcyjne [39,40]. Wciąż jednak zbyt mało jest wielopróbkowych prac pozwalających ocenić skalę zjawiska lekooporności w zakażeniach *Prototheca* spp.

Straty w produkcji mlecznej przy braku efektywności leczenia sprawiają, że hodowla krów dotkniętych prototekozą wymienia jest nieopłacalna i skutkuje najczęściej brakowaniem stada.

Niewiele wiadomo na temat źródeł i transmisji zakażeń *Prototheca* spp. Dotychczas przeważał pogląd, że glony *Prototheca* spp. należą do tzw. patogenów środowiskowych (ang. *environmental pathogens*), których głównym rezerwuarem jest środowisko przebywania krów. Drobnoustroje takie izolowane są typowo ze ściółki, obornika, żłobów, paszy i wody pitnej. Odróżnia je to od patogenów zakaźnych (ang. *infectious pathogens*), których źródłem jest głównie inny zakażony gruczoł mlekowy. Kontrola zakażeń wywołanych przez patogeny środowiskowe jest szczególnie trudna, z uwagi na ich stałą obecność, niemal nieusuwalność z otoczenia krów [41].

Podobnie jak nie ma skutecznej metody terapii prototekozы wymienia, brak standardów leczenia zakażeń prototekowych u ludzi. Problem stanowi często obserwowana lekooporność szczepów oraz nieprzewidywalność odpowiedzi klinicznej (np. brak skuteczności leczenia mimo wykazanej wrażliwości szczepów w warunkach *in vitro*). Leczenie ma więc charakter empiryczny i opiera się na obserwacji stanu chorego, tudzież historycznej kazuistyce [19].

Kluczowa w ocenie rokowań klinicznych jest szybka diagnoza prototekozы. Tę jednak utrudnia fakt, że glony *Prototheca* spp. wciąż często nie są brane pod uwagę jako możliwy czynnik etiologiczny choroby. Co więcej, drobnoustroje te, ze względu na podobieństwo makromorfologii, są nadal nierzadko mylnie rozpoznawane jako grzyby drożdżopodobne. Diagnostyka prototekozы opiera się głównie na wykazaniu drobnoustroju w kulturze lub badaniu histopatologicznym. W identyfikacji wykorzystuje się najczęściej analizę szczegółów mikromorfologii. Uwagę zwraca obecność charakterystycznych sporangiów wypełnionych sporangiosporami (ang. *mulberry-like structure*), co łatwo odróżnia algi od drożdżaków. Identyfikację gatunkową uzupełniają testy oparte na auksanografii węglowodanowej i alkoholowej. Od niedawna w ocenie przynależności do gatunku stosuje się metody molekularne, głównie technikę PCR i jej modyfikacje, niekiedy połączone z następczą analizą (sekwencyjną lub restrykcyjną) produktu amplifikacji. We wszystkich tych metodach, sekwencje tarczowe lokalizują się w obrębie

---

<sup>A</sup> Określenie to stosowane jest tutaj za piśmiennictwem, choć wobec braku kryteriów oporności u glonów *Prototheca* spp., zasadniejsze wydaje się sformułowanie „brak wrażliwości”.

klastra rDNA (gł. genów kodujących 18S rRNA i 5' fragment 28S rRNA) [5,42-47]. Większość z tych metod pozwala na identyfikację tylko najczęściej obserwowanych gatunków *Prototheca*, czynników etiologicznych prototekozy. Żadna z dotychczasowych metod nie dysponuje rozdzielczością umożliwiającą wykrycie wszystkich opisanych gatunków *Prototheca*. Największy w tym zakresie potencjał dyskryminacyjny ma technika MALDI-TOF (ang. *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time Of Flight mass spectrometry*), której skuteczność potwierdzono w identyfikacji 7 gatunków *Prototheca*, w tym obu genotypów *P. zopfii* [7,48]. Ograniczeniem metody jest wciąż jej niełatwa dostępność, niektóre techniczne aspekty użytkowania oraz konieczność dysponowania hodowlą (ang. *culture dependency*).

Przez długi czas glony *Prototheca* spp. pozostawały na marginesie zainteresowań naukowych, a większość badań miało charakter incydentalny lub fragmentaryczny. Jednak obserwowany wzrost liczby przypadków prototekozy w populacji ludzi i zwierząt, ekonomiczny wymiar strat spowodowanych zakażeniami *mastitis*, a także unikatowość *Prototheca* spp. w świecie roślin sprawiają, że zyskują one coraz większą uwagę sektora medycyny ludzkiej i weterynaryjnej.

Bardzo ograniczony zakres dotychczasowych badań nad glonami *Prototheca* spp. sprawia, że wiele aspektów ich biologii pozostaje niejasnych. Z punktu widzenia medycyny zakaźnej i interwencyjnej, główne kierunki badań powinny dotyczyć epidemiologii zakażeń prototekowych i problemu lekooporności. W wymiarze aplikacyjnym, konieczne jest doskonalenie metod diagnostycznych, umożliwiających szybkie wykrywanie prototekozy, ale przede wszystkim opracowanie nowych rozwiązań terapeutycznych, skutecznie zwalczających chorobę.

Badania, których wyniki ujęto w prezentowanym osiągnięciu naukowym, podjęto w zamiarze choćby częściowego wypełnienia sporej luki, jaka istnieje w obszarze wiedzy o glonach *Prototheca* spp. i wywoływanych przez nie zakażeniach. Przy tym, badania te osadzone zostały w trzech głównych nurtach tematycznych – epidemiologia, terapia i diagnostyka, co dyktuje porządek prezentacji prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.

## EPIDEMIOLOGIA PROTOTEKOZY BYDŁA

### PUBLIKACJE:

- ii.<sup>9</sup> Jagielski, T., Roeske, K., Bakula, Z., Piech, T., Wlazło, Ł., Bochniarz, M., Woch, P., Krukowski, H. A survey on the incidence of *Prototheca* mastitis in dairy herds in Lublin province, Poland. *J. Dairy Sci.*, 2019, **102**(1), 619-628. [49]
- iii. Jagielski, T., Krukowski, H., Bochniarz, M., Piech, T., Roeske, K., Bakula, Z., Wlazło, Ł., Woch, P. Prevalence of *Prototheca* spp. on dairy farms in Poland – a cross-country study. *Microb. Biotechnol.*, 2019, **12**(3), 556-566. [50]

Chociaż problem prototekozy u krów mlecznych znany jest od połowy ubiegłego wieku, a doniesień na ten temat, z różnych regionów świata, przybywa z każdym rokiem coraz więcej, epidemiologiczne aspekty prototekowych zakażeń bydła, w tym rezerwuar patogenu, źródła i wrota infekcji, drogi ich transmisji, zakres gospodarza i zakaźność są w dużej mierze nieznane. W piśmiennictwie przeważają opracowania w formie krótkich, wycinkowych raportów, zaś rzetelnych, przekrojowych analiz jest niewiele. Tym samym, dane na temat prevalencji choroby w populacji bydła mlecznego, w poszczególnych krajach, są nieściśle lub niepełne. Podobnie rzecz wygląda na gruncie

---

<sup>9</sup> Numeracja zachowana jak w pkt. 4b.

krajowym, gdzie poza kilkoma doniesieniami o charakterze lokalnym, nie przeprowadzono dotąd większego badania dla oceny częstości występowania prototekozy u krów.

W dwóch wymienionych wyżej pracach, podjęto próbę ustalenia częstości występowania zapaleń gruczołu mlekowego o etiologii prototekowej w hodowlach krów mlecznych na terenie Polski. Przy czym pierwsze badanie miało wymiar lokalny, drugie – ogólnokrajowy. W obu badaniach schemat eksperymentalny był ten sam; najpierw dokonywano wyboru gospodarstw, jako kryteria wyboru przyjmując historię wcześniejszych epizodów *mastitis* wywołanych przez glony *Prototheca* spp., „zdolność ankietową” gospodarstw (kompletność danych koniecznych do wypełnienia ankiety o gospodarstwie) oraz kooperatywność ich właścicieli (i), następnie przeprowadzano ocenę stanu zdrowotnego stada; kluczowy był tutaj test skriningowy na obecność *mastitis* u krów w postaci Terenowego Odczynu Komórkowego (TOK) wykonywany dla mleka ćwiartkowego (ii), pobierano próbki mleka od wszystkich krów z dodatnim wynikiem TOK i kilku krów z ujemnym wynikiem TOK (kontrola), a także szereg próbek środowiskowych, w bezpośrednim otoczeniu krów (ściółka, obornik, pasza, woda z poidel itp.) lub zabudowy gospodarskiej (gleba, błoto, kałuże itp.). Dodatkowo od krów z potwierdzonym prototekowym zapaleniem wymienia, a także od krów kontrolnych pobierano próbki krwi, kału oraz wymazy z pyska, nozdrzy, pochwy i odbytu. Wszystkie próbki kierowano do badania mikrobiologicznego (iii). Ostatnim etapem była identyfikacja wyrosłych w hodowli drobnoustrojów, w tym ustalenie zróżnicowania gatunkowego wśród szczepów *Prototheca* spp. W tym celu stosowano zarówno metody klasyczne (makro- i mikroskopowa ocena szczegółów morfologii kolonii/komórek, testy biochemiczne), jak i molekularne (rybotypowanie<sup>10</sup>) (iv).

W pierwszej pracy [49], zbadano 172 krowy z 10 gospodarstw na terenie województwa lubelskiego. Zebrano i mikrobiologicznie zbadano łącznie 627 prób (476 prób mleka i 151 wymazów) od 100 krów TOK-dodatnich (TOK+) i 23 krów kontrolnych (TOK-). Glony *Prototheca* spp. wyizolowano z mleka od 8 zwierząt (TOK+), z których tylko dwa wykazywały widoczne objawy zapalenia (*mastitis clinica*). Dodatkowo, 19 szczepów alg wyhodowano z wymazów od krów chorych (5) i kontrolnych (8). W końcu, spośród 91 pobranych próbek środowiskowych, 12 (13,2%) było pozytywnych na obecność prototek w hodowli. Ogólnie, częstość prototekowego *mastitis* u krów obliczono na 4,6% (8/172). Zarówno wśród próbek mleka, wymazów i próbek środowiskowych, dominował gatunek *P. zopfii* gen. 2 (częstość izolacji, odpowiednio: 100%, 79% i 66,7%). W próbkach środowiskowych odnotowano obecność *P. zopfii* gen. 1 (33,3%), a w wymazach *P. zopfii* gen. 1 (10,5%) i *P. blaschkeae* (10,5%).

Podobnych wyników na temat prewalencji zakażeń wymienia i struktury gatunkowej izolowanych alg dostarczyła praca ogólnopolska [50]. Tutaj badanie objęło 400 krów z 16 gospodarstw na terenie tyłuż województw. Do analizy włączono ogółem 1012 próbek (638 prób mleka, 374 wymazy) od 243 krów chorych i 54 krów kontrolnych, a także 199 próbek środowiskowych. Częstość występowania glonów *Prototheca* spp. w mleku badanych krów wyniosła 8,3% (33/400). Częstość izolacji prototek z wymazów krów chorych (TOK+) i kontrolnych wyniosła, odpowiednio 12,3% i 17,8%. W końcu, prototeki wykryto niemal w czwartej części próbek środowiskowych (21,2%). Podobnie jak w poprzedniej pracy, zaobserwowano, we wszystkich rodzajach próbek, dominację *P. zopfii* gen. 2. Tylko 1 przypadek *mastitis* wywołany był zakażeniem *P. blaschkeae*; w pozostałych 32 przypadkach, czynnikiem etiologicznym był gatunek *P. zopfii* gen. 2. W wymazach i próbkach środowiskowych stwierdzono obecność *P. zopfii* gen. 1, *P. zopfii* gen. 2 i *P. blaschkeae*, a ich częstość izolacji z tych dwóch źródeł wyrażają odsetki,

---

<sup>10</sup> Czyt. Wprowadzenie – str. 8.



odpowiednio: 5,6%, 8,6%, 1,6% oraz 7%, 10.1%, 4%. Przy tym, dodatnie wyniki wymazów otrzymywano zarówno w wypadku gdy próbkowane były krowy chore, jak i kontrolne. Z kolei, dodatnie wyniki dla próbek środowiskowych obserwowano niezależnie od tego, czy w danym gospodarstwie występowały krowy z prototekowym zapaleniem wymienia.

Odnosząc wyniki badań mikrobiologicznych do charakterystyki gospodarstw, nie stwierdzono istotnych korelacji. Nie udało się wskazać jednoznacznie czynników ryzyka dla wystąpienia prototekowego *mastitis* wśród bydła.

Z obu, krótko omówionych wyżej prac wyłania się dość spójny obraz epidemiologii zakażeń prototekowych u bydła. Jego główne cechy można streścić w kilku punktach:

- [1] Częstość występowania zakażeń wymienia krów mlecznych o etiologii prototekowej kształtuje się na poziomie ok. 5% w skali regionu i ok. 8% w skali kraju;
- [2] Glony *Prototheca* spp. są trzecim, po paciorkowcach i gronkowcach, najczęstszym czynnikiem etiologicznym *mastitis* u bydła;
- [3] Większość przypadków prototekowego *mastitis* to zakażenia subkliniczne, o znacząco podwyższonej, niż u zwierząt kontrolnych, liczbie komórek somatycznych (ang. *Somatic Cell Count*, SCC) przy nieuchwytnych różnicach w morfologii krwi obwodowej;
- [4] Niemal wyłącznym czynnikiem etiologicznym prototekowego *mastitis* jest *P. zopfii* gen. 2; pojedyncze przypadki wywołuje *P. blaschkeae*;
- [5] *Prototheca zopfii* gen. 2 dominuje wśród próbek z różnych anatomicznych lokalizacji zarówno u krów chorych, jak i zdrowych, a także w próbkach środowiskowych; w obu tych rodzajach próbek stwierdza się także obecność *P. zopfii* gen. 1 i *P. blaschkeae*; brak innych gatunków *Prototheca* wskazuje, że zajmują one odmienne nisze ekologiczne;
- [6] Brak związku między prewalencją zakażeń prototekowych w stadzie a częstością izolacji alg ze środowiska hodowlanego utrudnia zdefiniowanie środowiskowego rezerwuaru patogenu;
- [7] Wystąpienia przypadków *mastitis* w gospodarstwach, których środowisko nie wykazuje cech kontaminacji glonami *Prototheca* spp., może tłumaczyć swoista latencja zakażenia w gospodarzu i okresowe siewstwo patogenu z mlekiem; z kolei wystąpienia epidemiczne (ang. *outbreaks*), w podobnym kontekście środowiskowym, przemawiają za transmisją odzwierzęcą. Wydaje się zatem, że glony *Prototheca* spp. mają skomplikowany cykl infekcyjny i łączą w sobie cechy patogenów środowiskowych i zakaźnych.

## POSZUKIWANIE CZYNNIKÓW O AKTYWNOŚCI PRZECIWPROTOTEKOWEJ

### PUBLIKACJE:

- i. Anjos, C., Sabino, C., Celidonio Pogliani, F., Sellera, F., Ribeiro, M., Lincopan, N., Gargano, R., **Jagielski, T.** Algicidal effect of blue light on pathogenic *Prototheca* species. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2019, **26**, 210-213. [72]
- v. **Jagielski, T.**, Bakula, Z., Małgorzata Pleń, M., Kamiński, M., Nowakowska, J., Bielecki, J., Wolska, K.I., Grudniak, A.M. The activity of silver nanoparticles against microalgae of the *Prototheca* genus. *Nanomedicine*, 2018, **13**(9), 1025-1036. [70]
- vi. **Jagielski, T.**, Niedźwiecka, K., Roeske, K., Dyląg, M. 3-bromopyruvate as an alternative option for the treatment of protothecosis. *Front. Pharmacol.*, 2018, 9, e375. [66]

- viii. **Jagielski, T.**, Bakula, Z., Di Mauro, S., Casciari, C., Cambiotti, V., Krukowski, H., Turchetti, B., Ricchi, M., Manuali, E., Buzzini, P. A comparative study of the *in vitro* activity of iodopropynyl 1 butylcarbamate (IPBC) and amphotericin B (AMB) against *Prototheca* spp. *J. Dairy Sci.*, 2017, **100**(9), 7435-7445. [64]
- x. Alves, A. C., Capra, E., Morandi, S., Cremonesi, P., Pantoja, J. C., Langoni, H., de Vargas, A. P., da Costa, M. M., **Jagielski, T.**, Bolaños, C. A., Guerra, S. T., Ribeiro, M. G. *In vitro* algicidal effect of guanidine on *Prototheca zopfii* genotype 2 strains isolated from clinical and subclinical bovine mastitis. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2017, **64**(6), 419-423. [62]
- xii. **Jagielski, T.**, Buzzini, P., Lassa, H., Malinowski, E., Branda, E., Turchetti, B., Polleichtner, A., Roesler, U., Lagneau, P.-E., Marques, S., Silva, E., Thompson, G., Stachowiak, R., Bielecki, J. Multicenter E-test evaluation of *in vitro* susceptibility of *Prototheca* sp. isolates towards antifungal drugs. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2012, **67**(8), 1945-1947. [54]
- xv. Lassa, H., **Jagielski, T.**, Malinowski, E. Effect of different heat treatments and disinfectants on the survival of *Prototheca zopfii*. *Mycopathologia*, 2011, **171**(3), 177-182. [59]

Jak wspomniano we wstępie, glony *Prototheca* spp. cechuje kosmopolityzm występowania [1,51]. Ważnym czynnikiem sprzyjającym utrwaleniu ich obecności w środowisku jest duża wytrzymałość mechaniczna, którą prototeki zawdzięczają sporopoleninie, substancji podobnej kutynie czy suberynie, która powleka ściany komórkowe tych glonów, podobnie jak wielu innych zielenic. To właśnie dzięki obecności sporopoleniny, prototeki przeżywają proces chlorowania stosowany podczas oczyszczania ścieków (wiele szczepów *Prototheca* spp. izoluje się ze ścieków komunalnych) [51]. Również obecności sporopoleniny przypisuje się oporność glonów *Prototheca* spp. na wiele związków chemicznych, w tym antybiotyków i chemioterapeutyków, tradycyjnie stosowanych w medycynie człowieka i medycynie weterynaryjnej. Zjawisko wielorakiej lekooporności glonów *Prototheca* spp. było wielokrotnie podnoszone w literaturze [39,40,52,53]. Co więcej, sygnalizowane były przypadki braku korelacji między wynikami oznaczeń lekowrażliwości *in vitro* a odpowiedzią kliniczną (*in vivo*) [40,52].

W dyskusji problemu lekooporności glonów *Prototheca* spp., materiału dostarczyły także wyniki badań własnych, opublikowane w jednej z prac będących przedmiotem prezentowanego osiągnięcia naukowego [54]. W pracy tej wykazano znaczącą nieskuteczność *in vitro* większości obecnych na rynku farmakologicznym fungistatyków wobec glonów *Prototheca* spp. W badaniu testowano 10 leków p/grzybiczych na puli 144 szczepów *Prototheca* spp. (113 szczepów *P. zopfii* gen. 2 oraz 31 szczepów *P. blaschkeae*) pochodzących od krów z hodowli na terenie 6 krajów europejskich. Stwierdzono całkowity brak aktywności 5-fluorocytosyny (5-FC), flukonazolu (FCZ) i echinokandyn oraz tylko częściową (ograniczoną do części (38,2–68,1%) szczepów) aktywność itrakonazolu (ITZ), ketokonazolu (KTZ), posakonazolu i worikonazolu. Największą aktywność odnotowano dla amfoterycyny B (AMB), która w stężeniu 2 mg/L hamowała wzrost ponad 97% badanych szczepów [54].

W świetle tych wyników oraz prac, niestety dość nielicznych, innych autorów, AMB jawi się jako lek pierwszego wyboru w leczeniu prototekozy.

Istotnie, w leczeniu zakażeń u ludzi, AMB jest często lekiem pierwszoliniowym. Lek ten okazuje się szczególnie przydatny w terapii zakażeń rozsianych (w leczeniu zlokalizowanych infekcji skórnych dobre wyniki osiąga się stosując leki azolowe, gł. ITZ i KTZ) [18,19]. Istotną

wadą AMB są liczne objawy niepożądane, głównie ze strony wątroby i nerek [55]. Duża toksyczność AMB względem tkanki gruczołowej oraz wysokie koszty terapii sprawiają, że lek ten nie jest stosowany w leczeniu prototekowego *mastitis*. Wobec braku skutecznych i bezpiecznych leków przeciwko prototekozie, podejmowane są badania mające na celu opracowanie nowych rozwiązań terapeutycznych. Badania te prowadzone są dwutorowo. Z jednej strony sięga się do leków dobrze znanych praktyce klinicznej, modyfikując sposób ich podania i dawkowanie, testując różne kombinacje leków, obniżając przy tym dawki poszczególnych komponentów (co ma niwelować ich potencjalny efekt toksyczny), z drugiej – poszukuje się nowych związków o potencjalnej aktywności algobójczej, przy jednoczesnej minimalnej toksyczności wobec tkanek gospodarza.

W serii prac, krótko streszczonych poniżej, zawarto wyniki badań nakierowanych na rozpoznanie aktywności przeciwprototekowej 4 chemicznie bardzo odległych substancji, tj. guanidyny (i), 3-jodo-2-propynylo-N-butylokarbaminianu (IPBC) (ii), 3-bromopirogronianu (3-BP) (iii) oraz nanocząstek srebra (AgNPs, ang. *silver* (łac. *argentum*, Ag) *Nanoparticles*) (iv).

W piśmiennictwie nietrudno znaleźć prace wskazujące na algobójcze działanie preparatów na bazie jodu, w tym powszechnie stosowanych środków do dezynfekcji przed- i poudojowej krów [56-58]. Także badania własne były wśród pierwszych dokumentujących działanie algobójcze takich środków. W pracy, o której mowa, stanowiącej część osiągnięcia habilitacyjnego, oceniano działanie p/prototekowe trzech, komercyjnie dostępnych preparatów odkażających używanych do okołoudojowej higieny wymienia, a zawierających jako składnik aktywny jod (i), kwas dodecylobenzenosulfonowy (ang. *Dodecylbenzenesulphonic Acid*, DBSA) (ii) oraz chlorek didecylodimetyloamoniowy (ang. *Didecyldimethylammonium Chloride*, DDAC) (iii). Najsilniejszy efekt sterylizacyjny, utrzymujący się przy wielokrotnie mniejszych stężeniach w stosunku do pozostałych środków, wykazano dla preparatu jodowego [59].<sup>11</sup> W podobny sposób, ale w osobnej pracy, badano skuteczność w eliminacji prototek innego preparatu używanego w higienie doju mleka, który zawiera pochodną mocznika – guanidynę [62]. (Guanidyna z uwagi na swoje szerokospektralne właściwości bójcze jest często stosowana jako środek dezynfekcyjny i anstypetyczny w medycynie i przemyśle [63]). W badaniu własnym, ujętym w prezentowanym osiągnięciu, wykazano silną aktywność bójczą guanidyny w stosunku do 75 szczepów *P. zopfii* gen. 2. Przy tym, stosowane stężenia (%) guanidyny były znacznie niższe niż stężenia substancji aktywnej w większości preparatów badanych wcześniej [56,58].

Z uwagi na właściwości drażniące alkoholowych roztworów jodu, coraz większe znaczenie zyskują preparaty jodoforowe, takie jak jodopowidon (PVP-I), stanowiący kompleks jodu z poliwinylpirolidonem (PVP). Dzięki kompleksacji jodu z rozpuszczalnym w wodzie polimerem lub związkiem powierzchniowo-czynnym, jodofory cechuje zmniejszona drażliwość dla skóry przy zachowanej właściwości biobójczej. Aktywność p/prototekową jodoforów zbadano dotychczas tylko dla PVP-I [57,58]. Obiecujące wyniki tych badań były punktem wyjścia dla podjęcia prac nad innym związkiem tej grupy, tj. IPBC [64]. Operując grupą 138 szczepów *Prototheca* spp., określono wartości MIC (ang. *Minimal Inhibitory Concentration*), tj. MIC<sub>50</sub> i MIC<sub>90</sub> IPBC na poziomie, odpowiednio: 4 mg/L i 8 mg/L. Określono także wartości

---

<sup>11</sup> W tej samej pracy badano również przeżywalność glonów *Prototheca* spp. poddanych działaniu wysokich temperatur, stosowanych w termicznej konserwacji żywności. Wykazano, że piąta część badanych szczepów przeżywała warunki krótkotrwałej pasteryzacji (obróbka HTST, 72°C/15 sek.). Otrzymane wyniki potwierdzały termooporność glonów *Prototheca* spp., wynikającą z wcześniejszych ustaleń własnych oraz innych autorów [60,61].

MAC (ang. *Minimal Algicidal Concentration*), tj.  $MAC_{50}$  i  $MAC_{90}$  IPBC, które były jednakowe i wynosiły 16 mg/L. Wyniki tych oznaczeń skonfrontowano z wynikami analogicznych oznaczeń dla AMB. Wartości  $MIC_{50}$  i  $MIC_{90}$  wyniosły odpowiednio: 0,5 mg/L i 1 mg/L, zaś wartości  $MAC_{50}$  i  $MAC_{90}$  były równe wynosząc 8 mg/L. Zaobserwowano przy tym większą wrażliwość, na oba związki, szczepów *P. blaschkeae* w porównaniu ze szczepami *P. zopfii* gen. 2 ( $MIC_{50}$  IPBC, 1 mg/L vs 4 mg/L;  $MIC_{50}$  AMB, 0,25 mg/L vs 1 mg/L). Efekt kombinacji obu preparatów (IPBC+AMB) oceniono klasyczną metodą szachownicy (ang. *checkerboard assay*), wykazując zwiększone działanie algobójcze. Ponadto, w oparciu o indeks FIC (ang. *Fractional Inhibitory Concentration Index*, FICI), stwierdzono, że oddziaływanie między obu związkami miało głównie charakter addytywny ( $0,5 < FICI \leq 1$ ). Ostatnim etapem badania była ocena potencjału cytotoksycznego IPBC w porównaniu z AMB. Wykorzystano tutaj standardowy test redukcji soli tetrazolowej MTT, używając jako modelu komórek nabłonka krowiego wymienia (BME-UV1). Dla obu związków stwierdzono, że stosując stężenia odpowiadające ich minimalnym wartościom hamującym wzrost alg (IPBC, 0,5–8 mg/L; AMB, 0,125–2 mg/L), przeżywalność komórek nabłonkowych była bliska lub przekraczała 90%.

Bardzopodobnyschemateksperymentalnyprzyjęto w pracy badającej p/prototekową aktywność 3-BP. Tutaj znów impuls do badań dały wcześniejsze doniesienia o antydrobnoustrojowej aktywności 3-BP, w tym pilotażowe badanie z udziałem trzech szczepów *Prototheca* spp. [65]. W pracy włączonej do osiągnięcia, użyto 30 szczepów *Prototheca* spp., a oznaczenia wrażliwości wykonano nie tylko wobec 3-BP, ale też AMB. Podobnie jak w wypadku IPBC, zbadano interakcje obu związków oraz toksyczność 3-BP względem komórek linii BME-UV1, jak również mysich fibroblastów (L-929) [66]. Wartości MIC i MAC 3-BP dla wszystkich badanych szczepów *Prototheca* spp. zawierały się w przedziałach, odpowiednio: 0,5–3 mM (ca 83,5–500 mg/L) oraz 1,5–8 mM (ca 250–1335 mg/L). W przekroju gatunkowym, największą wrażliwość wykazano dla szczepów *P. wickerhamii*, a najmniejszą – dla szczepów *P. zopfii* gen. 2. Wyniki oznaczeń wrażliwości na AMB były zbieżne z wynikami opisanymi we wcześniejszej pracy [64]. Dla wszystkich badanych szczepów stwierdzono oddziaływanie synergistyczne 3-BP i AMB ( $FICI \leq 0,5$ ). Cytotoksyczność, oceniana przy stężeniach 3-BP odpowiadających najwyższym wartościom MIC (3 mM), a także 10-krotnie je przewyższających, była zawsze poniżej 20%. Cennym uzupełnieniem badania była analiza kinetyki transportu 3-BP do komórek prototek oraz określenie wewnątrzkomórkowego stężenia glutationu (GSH), wiązanych wcześniej z poziomem wrażliwości komórek na 3-BP [67]. Inaczej niż w badaniach nad drożdżakami, transport 3-BP wykazywał liniową zależność od stężenia analitu (3-BP), nie mając charakteru wysyceniowego. Przemawia to za brakiem białkowych transporterów błonowych, regulujących wnikanie 3-BP do komórek glonu. Z kolei analiza wewnątrzkomórkowego stężenia GSH wykazała korelację między jego przyrostem a mniejszą wrażliwością prototek na 3-BP, potwierdzając wcześniejsze obserwacje u drożdżaków [67].

W kolejnej pracy z cyklu poświęconego substancjom o aktywności p/prototekowej, skupiono się na nanocząstkach srebra (AgNPs). Istnieje pokaźne piśmiennictwo dokumentujące szerokie spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej AgNPs oraz ich praktyczne zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu [68,69]. Jednak potencjał biobójczy nanosrebra wobec glonów *Prototheca* spp. nie został dotąd zbadany. W badaniu własnym, po raz pierwszy, wyznaczono minimalne stężenia hamujące wzrost i bójcze (MIC/MAC) AgNPs dla 8 szczepów reprezentujących wszystkie poznane gatunki (genotypy) *Prototheca*.<sup>12</sup> Ponadto, zbadano toksyczność

<sup>12</sup> W momencie przygotowywania manuskryptu nie był jeszcze opisany gatunek *P. tumulicola*.



AgNPs względem linii nabłonkowej BME-UV1, a także prześledzono śródkomórkową penetrację AgNPs i wywołane ich obecnością zmiany strukturalne komórek glonowych [70]. Najmniej wrażliwe na AgNPs były *P. stagnora* (MIC>8 mg/L), *P. zopfii* gen. 2 (MIC=4 mg/L), *P. wickerhamii* (MIC=2 mg/L) i *P. miyajii* (MIC=2 mg/L). Dla wszystkich pozostałych szczepów (gatunków/genotypów) wartość MIC wyniosła 1 mg/L. Wartości MAC były równe wartościom MIC, wskazując na silne działanie bójcze nanocząstek. Stężenia AgNPs toksyczne dla 50% (CC<sub>50</sub>) i 90% (CC<sub>90</sub>) populacji komórek nabłonkowych były 2- lub 4-krotnie wyższe niż stężenia bójcze dla wszystkich (wyj. *P. stagnora*) badanych szczepów *Prototheca* spp. (7,5<CC<sub>50</sub><9 mg/L; 10,5<CC<sub>90</sub><12 mg/L). W obrazie z mikroskopu elektronowego, AgNPs lokalizowały się głównie w cytoplazmie komórek glonowych, poza obłonionymi pęcherzykami, sugerując, że do komórki wnikają raczej uwolnione z nanocząstek jony srebra (Ag<sup>+</sup>) niż same AgNPs. Nie obserwowano istotnych zmian w integralności osłon komórkowych lub uszkodzeń mechanicznych komórki pod działaniem AgNPs. Uwagę zwracało tylko postępujące wraz z czasem ekspozycji, kurczenie się protoplastu, wyraźne odstawanie plazmalemy od ściany komórkowej. Wydaje się, że śmierć komórki, w efekcie działania AgNPs, jest procesem stopniowym, związanym ze zmianami metabolizmu w warunkach reakcji na silny bodziec stresowy.

Ostatnia praca z cyklu poświęconego strategiom zwalczania glonów *Prototheca* spp., omawia wyniki doświadczeń nad potencjalnym wykorzystaniem światła niebieskiego w tzw. terapii fotodynamicznej zakażeń prototekowych. Metoda terapii fotodynamicznej (ang. *Photodynamic Therapy*, PDT) wykorzystuje cytotoksyczne działanie światła w obecności fotouczulacza (ang. *photosensitizer*, PS) i tlenu. Choć metoda PDT stosowana jest głównie w leczeniu schorzeń dermatologicznych i różnego typu nowotworów, znane są przykłady jej działania przeciwdrobnoustrojowego. Działanie takie zaobserwowano już dla płytko penetrującego światła niebieskiego [71]. W pracy własnej zbadano efekt generowanego przez diody LED światła niebieskiego ( $\lambda = 410$  nm), w różnych dawkach i o różnym czasie ekspozycji, na przeżywalność szczepów *Prototheca zopfii* gen. 1 i 2 oraz *P. blaschkeae* [72]. Efekt fototoksyczny zaobserwowano dla wszystkich glonów, choć niejednakowo silny dla poszczególnych szczepów. Ogólnie, glony *P. zopfii* gen. 1 i *P. blaschkeae* cechowała odpowiednio największa i najmniejsza wrażliwość na fotopromieniowanie. Dla *P. zopfii* gen. 1 i 2, efekt algobójczy odnotowano odpowiednio po 100-min. i 140-min. okresie ekspozycji, przy całkowitej dawce promieniowania wynoszącej 229,17 J/cm<sup>2</sup> i 320,85 J/cm<sup>2</sup>. Różnice w podatności komórek *Prototheca* spp. na efekt fototoksyczny mogą odzwierciedlać różnice w zawartości fotoczułych barwników lub wydajności systemów antyoksydacyjnych.

Główne wnioski wynikające z przedstawionych badań można sformułować następująco:

- [1] Glony *Prototheca* spp. cechuje niska wrażliwość na większość konwencjonalnych fungistatyków; największą aktywność p/prototekową stwierdzono dla AMB;
- [2] Wszystkie 4 badane substancje (tj. guanidyna, IPBC, 3-BP, AgNPs) cechowała wysoka aktywność bójcza wobec glonów *Prototheca* spp.; największe zbliżenie wartości MIC i MAC wykazano dla AgNPs (MAC/MIC=1), dowodząc ich największego potencjału bójczego;
- [3] W przekroju gatunkowym, najmniejszą wrażliwość na testowane substancje wykazano dla gatunku *P. zopfii* gen. 2, sugerując szczególne uwarunkowania fizjologiczne, prawdopodobnie związane z potencjałem chorobotwórczym (*P. zopfii* gen. 2 jest głównym czynnikiem etiologicznym zakażeń prototekowych u zwierząt);
- [4] IPBC, 3-BP i AgNPs, w stężeniach odpowiadających minimalnym stężeniom hamującym wzrost alg, nie wykazywały cytotoksyczności wobec ssaczych linii komórkowych,

- w tym nabłonka gruczołu mlekowego (wyniki porównywalne z układem kontrolnym, tj. bez testowanej substancji);
- [5] Właściwości mikrobiologiczne i farmakodynamiczne badanych substancji, ustalone w efekcie przeprowadzonych badań, wskazują na ich duży potencjał terapeutyczny, w warunkach *in vivo*;
  - [6] Guanidyna, i jej pochodne, oraz jodofory, takie jak IPBC czy PVP-I, mogą skutecznie zastąpić silniej drażniące i alergizujące wodne roztwory wolnego jodu, jako środki do dezynfekcji przed- i poudojowej (kontrola *mastitis* u bydła mlecznego);
  - [7] Guanidyna, jodofory, a jeszcze bardziej 3-BP i AgNPs mogą być potencjalnie użyte, w formie preparatów dowymieniowych, w leczeniu prototekowego *mastitis* lub w innej formule, do leczenia powierzchniowych zakażeń u zwierząt i ludzi;
  - [8] Z uwagi na wysoką aktywność biologiczną, synergizm działania z AMB, najniższą (spośród badanych substancji) cytotoksyczność, a także wcześniejsze doświadczenia kliniczne (w terapii onkologicznej), 3-BP wydaje się najlepszym kandydatem do ogólnoustrojowego leczenia prototekozy;
  - [9] W leczeniu dermatoprototekozy, szczególnie zmian zlokalizowanych i powierzchniowych, opcję terapeutyczną stwarza fotonaświetlanie (światłem niebieskim).

#### METODY IDENTYFIKACJI GLONÓW *PROTOTHECA* SPP. DIAGNOSTYKA ZAKAŻEŃ PROTOTEKOWYCH

##### PUBLIKACJE:

- iv. **Jagielski, T.**, Gawor, J., Bakuła, Z., Decewicz, P., Maciszewski, K., Karnkowska, A. *cytb* as a new genetic marker for differentiation of *Prototheca* species. *J. Clin. Microbiol.*, 2018, **56**(10). pii:e00584-18. [80]
- vii. **Jagielski, T.**, Gawor, J., Bakuła, Z., Zuchniewicz, K., Żak, I., Gromadka, R. An optimized method for high-quality DNA extraction from microalga *Prototheca wickerhamii* for genome sequencing. *Plant Meth.*, 2017, **13**, e77. [81]
- ix. **Jagielski, T.**, Dyląg, M., Roesler, U., Murugaiyan, J. Isolation of infectious microalga *Prototheca wickerhamii* from a carp (*Cyprinus carpio*) – a first confirmed case report of protothecosis in a fish. *J. Fish Dis.*, 2017, **40**(10), 1417-1421. [30]
- xi. Żak, I., **Jagielski, T.**, Kwiatkowski, S., Bielecki, J. *Prototheca wickerhamii* as a cause of neuroinfection in a child with congenital hydrocephalus. First case of human protothecosis in Poland. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2012, **74**(2), 186-189. [82]
- xiii. Ahrholdt, J., Murugaiyan, J., Straubinger, R. K., **Jagielski, T.**, Roesler, U. Epidemiological analysis of worldwide bovine, canine and human clinical *Prototheca* isolates by PCR genotyping and MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping. *Med. Mycol.*, 2011, **50**(3), 234-243. [78]
- xiv. **Jagielski, T.**, Lassa, H., Ahrholdt, J., Malinowski, E., Roesler, U. Genotyping of bovine *Prototheca* mastitis isolates from Poland. *Vet. Microbiol.*, 2011, **149**(1-2), 283-287. [77]

- xvi. **Jagielski, T.**, Lassa, H., Ahrholdt, J., Roesler, U., Malinowski, E. Molecular characterization of Polish *Prototheca zopfii* mastitis isolates and first isolation of *Prototheca blaschkeae* in Poland. *Pol. J. Vet. Sci.*, 2010, **13**(4), 725-729. [76]

Przez długi czas, diagnostyka zakażeń wywoływanych przez glony *Prototheca* spp. i w ogóle identyfikacja tych drobnoustrojów opierała się wyłącznie na ocenie ich cech fenotypowych, w tym szczegółów morfologii kolonii i komórek, względnie profilu asymilacji różnych źródeł węgla (auksanografia). Dopiero od nieco ponad 10 lat, do identyfikacji prototek wykorzystuje się typowanie genetyczne, wykrywające rodzajowe i gatunkowe specyficzności sekwencji w obrębie klastera rDNA, głównie genów kodujących 18S i 28S rRNA (rybotypowanie). Obecnie dostępnych jest kilka metod, bazujących na technologii PCR, które w oparciu o polimorfizm sekwencji rDNA umożliwiają rozpoznanie głównych gatunków *Prototheca* [5,42-47]. Pierwszą taką metodę zaproponował w 2006 roku Rösler et al. [5]. Na podstawie analizy porównawczej sekwencji fragmentu 5' genu kodującego 18S rRNA, dla kolekcji szczepów *Prototheca* spp., opracowali protokół PCR, którego trzy warianty, stosowane łącznie, pozwalają rozróżnić trzy gatunki (genotypy), najczęściej izolowane od krów i ze środowiska hodowlanego, tj. *P. zopfii* gen. 1, *P. zopfii* gen. 2 i *P. blaschkeae* [5]. W niedługim czasie, metoda gatunkowo-(genotypowo-)specyficznego PCR, stała się „złotym standardem” w identyfikacji szczepów *Prototheca* spp., izolowanych z przypadków *mastitis* o prototekowej etiologii [73-75]. W odniesieniu do szczepów bydłych izolowanych w Polsce, omawianą metodę zastosowano po raz pierwszy w 2010 roku, a wyniki wykonanych oznaczeń opisano w dwóch pracach, stanowiących część prezentowanego osiągnięcia [76,77]. Obie te prace miały pionierski charakter w tym sensie, że po raz pierwszy w sposób miarodajny, dały wgląd w strukturę gatunkową szczepów *Prototheca* spp. izolowanych z krajowych przypadków *mastitis* u bydła. Ogólnie, w obu pracach, zbadano łącznie 44 szczepy wyhodowane z mleka krów z rozpoznaniem *mastitis* o obrazie klinicznym (33) lub podklinicznym (11) z 15 gospodarstw na terenie 6 województw. Wszystkie szczepy, z wyjątkiem jednego, oznaczono jako *P. zopfii* gen. 2. Jeden szczep oznaczono jako *P. blaschkeae*, a jego pełną charakterystykę zawarto w jednej z dwóch omawianych prac [76].<sup>13</sup>

Przełomem w diagnostyce mikrobiologicznej było pojawienie się techniki MALDI-TOF. W ostatnim czasie jest ona coraz częściej obecna w klinicznych laboratoriach diagnostycznych. Metoda ta znalazła również zastosowanie w identyfikacji gatunkowej glonów *Prototheca* spp. W 2012 roku, Murugaiyan et al. wyznaczyli referencyjne widma spektralne dla 7 gatunków *Prototheca*, włączając oba genotypy (1 i 2) *P. zopfii* [48]. W tym samym roku powstało pierwsze opracowanie ewaluacyjne metody MALDI-TOF w identyfikacji międzynarodowej kolekcji szczepów *Prototheca* spp. izolowanych z klinicznych przypadków prototekozy u człowieka i zwierząt [78]. Badanie, o którym mowa, i które stanowi część osiągnięcia habilitacyjnego, włączało ogółem 350 szczepów (342 szczepy bydłowe, 6 psich i 2 ludzkie) pochodzących z 12 krajów świata. W liczbie tej były 44 szczepy polskie, badane już we wcześniejszych pracach [76,77]. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono pełną zgodność oznaczeń nową techniką MALDI-TOF z wynikami rybotypowania. Potwierdzono też dominację *P. zopfii* gen. 2 jako głównego czynnika etiologicznego prototekozy. Genotyp ten odpowiadał za przeszło 90% wszystkich przypadków prototekozy bydła, ale też wszystkie przypadki prototekozy u psów

<sup>13</sup> Z dwóch omawianych prac, jedna miała charakter pilotażowy i włączała 9 szczepów *Prototheca* spp. To w niej zawarto opis pierwszego polskiego szczepu *P. blaschkeae* [76]. W drugiej pracy, pulę szczepów uzupełniono do 44; zastosowano też dodatkową metodę, weryfikującą oznaczenia (PCR-RFLP) [77].

i jedyne dwa badane przypadki zachorowań u człowieka. Co ciekawe, dwa przypadki prototekowego *mastitis* były wynikiem zakażenia szczepami *P. zopfii* gen. 1. Niedawno, potwierdzono udział tego genotypu w etiologii zakażeń prototekowych także u ludzi [79].

Mimo niewątpliwych zalet, metoda MALDI-TOF ma też swoje wady. Jako że opiera się ona na analizie białek występujących w dużych ilościach, takich jak białka rybosomowe, próbką badaną musi być żywa kultura (kolonia lub hodowla płynna). Co więcej, taka próbka musi być wysokiej czystości, gdyż zanieczyszczenia istotnie zaburzają widma białkowe. Ponadto, metoda MALDI-TOF, choć szybka i w znacznym stopniu zautomatyzowana, wymaga specjalistycznego przeszkolenia użytkowników. Zniechęcają też wysokie koszty zakupu i konserwacji aparatury. W końcu, wynik identyfikacji zależy od zasobności baz danych, do których dostęp wymaga nierzadko dodatkowych subskrypcji. Z uwagi na powyższe ograniczenia, wciąż pożądana jest prostsza, tańsza i łatwiej dostępna metoda identyfikacji glonów *Prototheca* spp., choć o podobnej MALDI-TOF zdolności dyskryminacyjnej. Naprzeciw tej potrzebie wychodzą badania opisane w kolejnej pracy, wchodzącej w skład osiągnięcia habilitacyjnego [80]. Punktem węzłowym tych badań była analiza porównawcza genomów reprezentujących szczepy typowe wszystkich znanych (9) gatunków (genotypów) *Prototheca* w poszukiwaniu genów markerowych umożliwiających wiarygodne różnicowanie na poziomie gatunku (genotypu).<sup>14</sup> Spośród kilku wstępnie wytypowanych *loci*, wybrano ostatecznie mitochondrialny gen *cytb*, kodujący apocytochrom b, składową kompleksu bc1 w łańcuchu oddechowym. Specyficzność gatunkową sekwencji *cytb*, zlokalizowanych w złożeniach genomowych szczepów typowych dla 9 gatunków (genotypów) *Prototheca*, potwierdzono w analizie przeprowadzonej dla 12 kolejnych szczepów *Prototheca* spp., o różnej afiliacji gatunkowej. Tym razem sekwencje otrzymano stosując nowo opracowany protokół amplifikacji genu *cytb* (fragment wielkości ok. 644 pz). Na podstawie wszystkich (21) sekwencji *cytb* wykreślono dendrogram, a w jego rysunku wyodrębniono precyzyjnie 9 kładów odpowiadających opisanym gatunkom (genotypom) *Prototheca*. Podobne drzewa wykreślono w oparciu o sekwencje rDNA (tj. częściowe sekwencje genów kodujących 18S i 28S rRNA oraz sekwencje niekodujące ITS). Wykazano, że gen *cytb* ma największy potencjał różnicujący i jako jedyny separuje wszystkie gatunki (genotypy) *Prototheca*. Szczegółowa analiza *in silico* sekwencji *cytb* pochodzących z różnych gatunków (genotypów) *Prototheca* pozwoliła zaproponować, wykrywającą je wszystkie, prostą metodę PCR–RFLP (ang. *PCR–Restriction Fragment Length Polymorphism*).

Znalezienie genu *cytb* i ocena jego przydatności jako markera taksonomicznego były możliwe dzięki analizom porównawczym sekwencji genomowych szczepów różnych gatunków *Prototheca*. Pozyskanie takich sekwencji trwało kilka lat, co było związane z niepowodzeniami, związanymi z trudnością izolacji prototekowego DNA (o parametrach ilościowych i jakościowych pozwalających użyć go do sekwencjonowania genomowego).<sup>15</sup> Punktem zwrotnym było wypracowanie oryginalnej metody izolacji całkowitego DNA z komórek glonu, której szczegóły (protokół) podano w osobnej publikacji, włączonej do prezentowanego osiągnięcia naukowego [81]. Kluczowy w zaproponowanej metodzie był dobór czynników działających litycznie wobec ściany komórkowej i otwierających protoplast komórki glonu. W obranym podejściu połączono liżę mechaniczną (pulweryzacja przy użyciu szklanych kulek) z aktywnością surfaktantów (Triton-X100, SDS, CTAB) i proteaz (proteinaza K). Dodatkowo wprowadzonym etapem było

<sup>14</sup> Szczegółowe wyniki badań genomicznych w obrębie rodzaju *Prototheca* są przedmiotem osobnej publikacji (obecnie w końcowej fazie przygotowania).

<sup>15</sup> Trudności te należy wiązać ze specyfiką struktury i składu chemicznego ściany komórkowej glonów *Prototheca* spp.



ultrawierowanie w gradiencie chlorku cezu, nacelowane na rozdział frakcji DNA jądrowego i organellarnego (plastydowego i mitochondrialnego).

Dwie ostatnie prace, zamykające tę część prezentacji osiągnięcia naukowego, mają charakter kazuistyczny [30,82]. Pierwsza podaje opis przypadku neuroinfekcji prototekowej u dziecka, pierwszego udokumentowanego przypadku prototekozy człowieka w Polsce [82]. Jako czynnik etiologiczny zidentyfikowano *P. wickerhamii*. Określając profil lekowrażliwości szczepu, wykazano jego oporność na 5-FC, FCZ oraz ITZ. Wyleczenie uzyskano stosując kombinację FCZ i AMB (śmierć dziecka już po eradykacji zakażenia, była następstwem wrodzonego wodogłowia).

W drugiej pracy opisano przypadek prototekozy u padniętego karpia (*Cyprinus carpio*), odłowionego ze stawu hodowlanego na Pojezierzu Warmińsko-Mazurskim [30]. Warto podkreślić, że jest to pierwszy przypadek prototekozy u ryb, potwierdzony metodami fenotypowymi i molekularnymi. Jedyny wcześniej znany przypadek zakażenia prototekowego u ryb, opisano u łososia (*Salmo salar*) [31]. Jednak z uwagi na brak zachowanego szczepu, a także fakt, że diagnozę oparto wyłącznie na cechach fenotypowych, autentyczność tego przypadku może budzić wątpliwości.

W identyfikacji obu powyższych przypadków kluczową rolę odegrały nowoczesne metody diagnostyczne, takie jak sekwencjonowanie rDNA i typowanie metodą MALDI-TOF.

Ogólnie, wyniki omówionych wyżej badań streszczają się w następujących konkluzjach:

- [1] W identyfikacji gatunkowej czynników etiologicznych prototekowego *mastitis* dobrze sprawdza się metoda rybotypowania (PCR/PCR-RFLP) oraz profilowanie techniką MALDI-TOF;
- [2] Międzygatunkowa analiza porównawcza genomów prototekowych pozwoliła wyznaczyć nowy marker molekularny (*cytb*), alternatywny wobec *loci* rDNA, o zastosowaniu w identyfikacji i ocenie pokrewieństw filogenetycznych glonów *Prototheca* spp.;
- [3] W oparciu o marker *cytb* zaproponowano nową metodę (PCR-RFLP) umożliwiającą prostą i szybką identyfikację wszystkich 9 gatunków (genotypów) glonów *Prototheca* spp.;
- [4] Dzięki zastosowaniu kombinacji metod klasycznych (fenotypowych) i genotypowania opisano dwa rzadkie przypadki prototekozy: u człowieka (pierwszy przypadek w Polsce) oraz karpia (pierwszy potwierdzony przypadek prototekozy u ryb).

## PODSUMOWANIE

Osiągnięcie naukowe, którego opis przedstawiono powyżej, tworzy komplet 16 prac eksperymentalnych, opublikowanych w okresie 9 lat (2010–2019). Wyniki do tych prac pochodzą z serii badań przeprowadzonych w podobnym okresie (2010–2018), wspartych finansowo dwoma grantami przyznanymi, w ramach wygranych konkursów „SONATA” i „PRELUDIUM”, przez Narodowe Centrum Nauki.<sup>16</sup> Te trwające 9 lat badania złożyły się na pierwsze

---

<sup>16</sup> (i) «Ocena potencjału epidemicznego chorobotwórczych glonów z rodzaju *Prototheca* w Polsce: badania środowiskowe, kliniczne i molekularne prototekozy u zwierząt» (projekt «SONATA»; kierownik projektu: dr Tomasz Jagielski; nr projektu: 2014/15/D/NZ7/01797); (ii) «Poszukiwanie genów kodujących czynniki wirulencji *Prototheca wickerhamii*, oportunistycznego patogenu dla ludzi. Badanie pilotażowe otwierające projekt sekwencjonowania genomu *Prototheca wickerhamii*» (Projekt «PRELUDIUM»; kierownik projektu: mgr Zofia Bakuła; opiekun naukowy projektu: dr Tomasz Jagielski; nr projektu: 2013/09/N/NZ2/00248).

tak kompleksowe studium eksperymentalno-badawcze poświęcone glonom *Prototheca* spp., na pewno w Polsce, a być może i na świecie.

Chociaż poszczególne prace, wchodzące w skład osiągnięcia, mają różny charakter i ciężar gatunkowy, łączy je przedmiot i celowość badań, czyli glony *Prototheca* spp. i poznanie ich biologii w kontekście wywoływanych przez nie zakażeń. Ścisłej, prezentowane prace opisują biologię patogenu trójaspektowo, tj. z punktu widzenia epidemiologii, diagnostyki i leczenia prototekozy. Pod względem koncepcyjnym (projekt układów doświadczalnych), metodycznym i analitycznym, badania, na wynikach, których bazuje osiągnięcie, łączą różne dziedziny nauki, w tym mikrobiologię farmaceutyczną i kliniczną, epidemiologię, weterynarię, genomikę i bioinformatykę. Badania te mają zatem charakter interdyscyplinarny, a do tego, poza walorami poznawczymi, niosą spory ładunek aplikacyjny. Należy też podkreślić rolę, jaką w powstaniu wielu prac, włączonych do osiągnięcia, miała współpraca lub konsultacja z najważniejszymi, w kraju i na świecie, specjalistami w zakresie badań nad glonami *Prototheca* spp. Efektem tej kooperacji było m.in. powołanie grupy roboczej «Medical Phycology: Protothecosis and Chlorellosis», w ramach ISHAM (International Society of Human and Animal Mycology).

Jako najważniejsze dla omawianego osiągnięcia należy wskazać: ustalenie prewalencji i wykreślenie struktury epidemiologicznej zakażeń prototekowych u bydła mlecznego w Polsce (i); podanie charakterystyki 4 substancji wykazujących aktywność p/prototekową (ii); propozycję nowego układu markerowego o znaczeniu diagnostycznym i filogenetycznym (iii); opracowanie nowego algorytmu identyfikacji glonów *Prototheca* spp. (iv).

Wnioski wyprowadzone na podstawie badań, których syntezę stanowi prezentowane osiągnięcie naukowe, są cennym drogowskazem dla opracowania i wdrożenia nowych strategii diagnostycznych, terapeutycznych i profilaktycznych w zakażeniach prototekowych. Dają też asumpt do powołania narodowego programu nadzoru takich zakażeń w Polsce.

## PLANY NAUKOWE

W zakresie badań nad glonami *Prototheca* spp. planuję w najbliższym czasie (1–2 lat) ukończenie następujących projektów:

- [1] Ocena wrażliwości glonów *Prototheca* spp. na leki azolowe nowej generacji (efinakonazol, izawukonazol, albakonazol, lulikonazol); badanie aktywności p/prototekowej w/w leków zakłada oznaczenie wartości MIC/MAC, a także ustalenie charakteru oddziaływań między lekami w układach skojarzeniowych (metoda szachownicy; analiza *time-kill*; analiza izobolograficzna);
- [2] Określenie profilu gatunkowego, wraz z oceną wrażliwości na wybrane leki o potwierdzonej aktywności p/prototekowej (np. AMB), dla szczepów *Prototheca* spp. izolowanych z przypadków prototekozy u ludzi oraz małych zwierząt, gł. psów i kotów; badanie realizowane jest we współpracy z licznymi ośrodkami naukowymi na świecie; identyfikacja gatunkowa prowadzona jest przy użyciu markera *cytb*, a testy lekowrażliwości wykonywane są zgodnie z zaleceniami CLSI (*Clinical & Laboratory Standards Institute*) dla grzybów drożdżakowych;<sup>17</sup>

---

<sup>17</sup> Wobec braku wytycznych dla oznaczania lekowrażliwości u glonów *Prototheca* spp., stosuje się tutaj protokoły CLSI zalecane dla grzybów drożdżakowych [54].

- [3] Charakterystyka strukturalna i funkcjonalna genomu *P. wickerhamii* – obecnie przygotowywana jest publikacja podsumowująca wyniki blisko 4-letnich badań;
- [4] Genomika porównawcza glonów *Prototheca* spp. – obecnie zbierane są wyniki analiz porównawczych genomów reprezentujących szczepy typowe głównych gatunków *Prototheca*, etiologicznie powiązanych z wystąpieniami prototekozy u ludzi i zwierząt: *P. zopfii* gen. 1, *P. zopfii* gen. 2, *P. blaschkeae*, a także gatunków typowo środowiskowych: *P. stagnora*, *P. ulmea*; wykorzystane zostaną tutaj także wyniki otrzymane wcześniej dla *P. wickerhamii*, głównego patogenu człowieka; podstawowym celem tych badań jest próba zdefiniowania molekularnych determinantów chorobotwórczości, zakaźności (transmisyjności) i wirulencji, a także czynników genetycznych związanych z mechanizmami działania i oporności na leki.

Ponadto, planuję rozpocząć szczegółowe badania nad potencjałem patogennym glonów *Prototheca* spp. Badaniom tym poświęcony jest wniosek projektowy złożony w Narodowym Centrum Nauki (program „SONATA” – obecnie w rozpatrywaniu). Celem projektu jest określenie zdolności różnych gatunków *Prototheca* do indukowania miejscowych lub uogólnionych infekcji oraz zbadanie oddziaływań gospodarz-patogen. Projekt zakłada podejście dwukierunkowe, łączące badania *in vitro* z wykorzystaniem różnych linii komórkowych oraz *in vivo*, na mysim modelu doświadczalnym.

Zamierzam również kontynuować, we współpracy z Uniwersytetem Przyrodniczym w Lublinie, badania weterynaryjne i środowiskowe prototekozy bydłowej w Polsce. Ważną ich częścią będzie ocena kliniczna (*in vivo*) skuteczności wybranych preparatów (o potwierdzonej aktywności p/prototekowej w warunkach *in vitro*) w leczeniu prototekowego *mastitis*;

W końcu, planuję rozwinięcie badań w zakresie habitatu alg *Prototheca* spp. włączając nowe stanowiska środowiskowe, niezwiązane z hodowlą zwierzęcą (naturalne zbiorniki wodne, zbiorniki roślinne i siedliska zwierząt dzikich). Chodzi tu o gruntowne rozpoznanie dystrybucji środowiskowej glonów *Prototheca* spp., nawiązując do ostatnich tego typu badań z lat 80. ub. w.

## PIŚMIENNICTWO

1. Jagielski, T., Lagneau, P.-E. A pseudofungal infection. *J. Mycol. Méd.*, 2007, 17:261-70.
2. Tubaki, K., Soneda, M. Cultural and taxonomic studies on *Prototheca*. *Nagaoa (Mycol. J. Nagao Inst)*, 1959, 6:25-34.
3. Cooke, W. B. Studies in the genus *Prototheca*. II. Taxonomy. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.*, 1968, 84:217-220.
4. Pore, R. S. The association of *Prototheca* spp. with slime flux in *Ulmus americana* and other trees. *Mycopathologia*, 1986, 94:67-73.
5. Roesler, U., et al. Diversity within the current algal species *Prototheca zopfii*: a proposal for two *Prototheca zopfii* genotypes and description of a novel species, *Prototheca blaschkeae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2006, 56:1419-1425.
6. Satoh, K., et al. *Prototheca cutis* sp. nov., a newly discovered pathogen of protothecosis isolated from inflamed human skin. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2010, 60:1236-1240.
7. Masuda, M., et al. *Prototheca miyajii* sp. nov., isolated from a patient with systemic protothecosis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2016, 66:1510-1520.
8. Nagatsuka, Y., et al. *Prototheca tumulicola* sp. nov., a novel achlorophyllous, yeast-like microalga isolated from the stone chamber interior of the Takamatsuzuka Tumulus. *Mycoscience*, 2016, 58:53-59.

9. Morandi, S., et al. *Prototheca blaschkeae* subsp. *brasiliensis* subsp. nov., isolated from cow milk. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2017, 67:3865-3871.
10. Guiry, M. D. How many species of algae are there? J. Phycol., 2012, 48:1057-1063.
11. Hafner, S., et al. Green algal peritonitis in 2 cows. Vet. Pathol., 2012, 50:256-259.
12. Lima, E. F., et al. Disseminated infection by *Chlorella* sp. in a sheep. Cienc. Rural., 2014, 44:1253-1256.
13. Hart, J., et al. First case of *Chlorella* wound infection in a human in Australia. New Microbes New Infect., 2014, 2:132-133.
14. Jones, J. W., et al. Green algal infection in a human. Am. J. Clin. Pathol., 1983, 80:102-107.
15. Crespo, C., et al. *Coccomyxa* sp. (Chlorophyta: Chlorococcales), a new pathogen in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) of Vigo estuary (Galicia, NW Spain). J. Invertebr. Pathol., 2009, 102:214-219.
16. Vázquez, N., et al. Host-parasite relationship of the geoduck *Panopea abbreviata* and the green alga *Coccomyxa parasitica* in the Argentinean Patagonian coast. J. Invertebr. Pathol., 2010, 105:254-260.
17. Tartar, A. The non-photosynthetic algae *Helicosporidium* spp.: emergence of a novel group of insect pathogens. Insects, 2013, 4:375-391.
18. Jagielski, T. Protothecosis – etiologia, obraz kliniczny, terapia i diagnostyka laboratoryjna. Mikol. Lek., 2006, 13:307-313.
19. Lass-Flörl, C., Mayr, A. Human protothecosis. Clin. Microbiol. Rev., 2007, 20:230-242.
20. Todd, J. R., et al. Medical phycology 2017. Med. Mycol., 2018, 56:S188-S204.
21. Stenner, V. J., et al. Protothecosis in 17 Australian dogs and a review of the canine literature. Med. Mycol., 2007, 45:249-266.
22. Endo, S., et al. The first case of feline *Prototheca wickerhamii* infection in Japan. J. Vet. Med. Sci., 2010, 72:1351-1353.
23. Huth, N., et al. *Prototheca zopfii* genotype 2-induced nasal dermatitis in a cat. J. Comp. Pathol., 2015, 152:287-290.
24. Camboim, E. K., et al. Protothecosis by *Prototheca wickerhamii* in goats. Mycoses, 2011, 54:e196-e200.
25. Macedo, J. T., et al. Cutaneous and nasal protothecosis in a goat. Vet. Pathol., 2008, 45:352-354.
26. Sileo, L., Palmer, N.C. Probable cutaneous protothecosis in a beaver. J. Wild. Dis., 1973, 9:320-322.
27. Frese, K., Gedek, B. Ein Fall von Protothecosis beim Reh. Berl Münch. Tierärztl. Wschr., 1968, 81:171-178.
28. Mettler, F. Generalisierte Protothekose bei einem Flughund (*Pteropus lylei*). Vet. Pathol., 1975, 12:118.
29. Schöniger, S., et al. N. Roschanski, U. Rösler, A. Vidovic, M. Nowak, O. Dietz, M.M. Wittenbrink, H.A. Schoon, *Prototheca* species and *Pithomyces chartarum* as causative agents of rhinitis and/or sinusitis in horses. J. Comp. Pathol., 2016, 155:121-125.
30. Jagielski, T., et al. Isolation of infectious microalga *Prototheca wickerhamii* from a carp (*Cyprinus carpio*) - a first confirmed case report of protothecosis in a fish. J. Fish Dis., 2017, 40:1417-1421.
31. Smith, C. G. Ultrastructural study of *Prototheca salmonis* and comparison with known isolates of *Prototheca*. Mycopathologia, 1980, 71:95-101.
32. Ito, T., et al. Experimental infection of bovine mammary gland with *Prototheca zopfii* genotype 1. J. Vet. Med. Sci., 2011, 73:117-119.
33. Huijps, K., et al. Costs of mastitis: facts and perception. J. Dairy Res., 2008, 75:113-120.



34. Lerche, M. Eine durch Algen (*Prototheca*) hervorgerufene Mastitis der Kuh. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr., 1952, 4:64-69.
35. Lagneau, P.-E., **Jagielski, T.**, Melo Dos Santos, V. Protothecosis. [w:] Infectious and parasitic diseases of livestock. (red. Lefèvre, P.-C., Blancou, J., Chermette, R., Uilenberg, G.) t. 2(4), 108:1417-1424. Lavoisier, Tec&Doc, 2010.
36. Malinowski, E., et al. Isolation of *Prototheca zopfii* from inflamed secretion udders. Bull. Vet. Inst. Puławy, 2002, 46:295-299.
37. Krukowski, H., et al. Stan zdrowotny gruczołu mlekowego krów w gospodarstwach wielkostatnych. Med. Wet., 2009, 65:409-412.
38. Janosi, S., et al. Review of the microbiological, pathological, and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga *Prototheca zopfii*. Vet. Q., 2001, 23:58-61.
39. Buzzini, P., et al. Large-scale screening of the in vitro susceptibility of *Prototheca zopfii* towards polyene antibiotics. Med. Mycol., 2008, 46:511-514.
40. Tortorano, A. M., et al. *In vitro* activity of conventional antifungal drugs and natural essences against the yeast-like alga *Prototheca*. J. Antimicrob. Chemother., 2008, 61:1312-1314.
41. Krukowski, H. Drobnoustroje środowiskowe jako przyczyna *mastitis* u krów. Med. Wet., 2006, 62:189-192.
42. Marques, S., et al. Internal transcribed spacer sequence-based rapid molecular identification of *Prototheca zopfii* and *Prototheca blaschkeae* directly from milk of infected cows. J. Dairy Sci., 2015, 98:3001-3009.
43. Capra, E., et al. Simultaneous identification by multiplex PCR of major *Prototheca* spp. isolated from bovine and buffalo intramammary infection and bulk tank. Lett. Appl. Microbiol., 2014, 59:642-647.
44. Cremonesi, P., et al. Technical note: Identification of *Prototheca* species from bovine milk samples by PCR-single strand conformation polymorphism. J. Dairy Sci., 2012, 95:6963-6968.
45. Gao, J., et al. A novel DNA extraction and duplex polymerase chain reaction assay for the rapid detection of *Prototheca zopfii* genotype 2 in milk. Lett. Appl. Microbiol., 2011, 53:278-282.
46. Ricchi, M., et al. A rapid real-time PCR/DNA resolution melting method to identify *Prototheca* species. J. Appl. Microbiol., 2011, 110:27-34.
47. Onozaki, M., et al. Rapid identification of *Prototheca zopfii* by nested polymerase chain reaction based on the nuclear small subunit ribosomal DNA. J. Dermatol. Sci., 2009, 54:56-59.
48. Murugaiyan, J., et al. Establishment of a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry database for rapid identification of infectious achlorophyllous green micro-algae of the genus *Prototheca*. Clin. Microbiol. Infect., 2012, 18:461-467.
49. **Jagielski, T.**, et al. A survey on the incidence of *Prototheca* mastitis in dairy herds in Lublin province, Poland. J. Dairy Sci., 2019, 102:619-628.
50. **Jagielski, T.**, et al. Prevalence of *Prototheca* spp. on dairy farms in Poland – a cross-country study. Microb. Biotechnol., 2019, 12:556-566.
51. Pore, R. S., et al. *Prototheca* ecology. Mycopathologia, 1983, 81:49-62.
52. Sobukawa, H., et al. *In vitro* susceptibility of *Prototheca zopfii* genotypes 1 and 2. Med. Mycol., 2011, 49:222-224.
53. Gao, J., et al. Characterization of *Prototheca zopfii* associated with outbreak of bovine clinical mastitis in herd of Beijing, China. Mycopathologia, 2012, 173:275-281.
54. **Jagielski, T.**, et al. Multicenter E-test evaluation of in vitro susceptibility of *Prototheca* sp. isolates towards antifungal drugs. J. Antimicrob. Chemother., 2012, 67:1945-1947.
55. Laniado-Laborín, R., Cabrales-Vargas, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. Rev. Iberoam. Micol., 2009, 26:223-227.

56. Salerno, T., et al. *In vitro* algacide effect of sodium hypochlorite and iodine based antiseptics on *Prototheca zopfii* strains isolated from bovine milk. Res. Vet. Sci., 2010, 88:211–213.
57. Gonçalves, J. L., et al. Biofilm-producing ability and efficiency of sanitizing agents against *Prototheca zopfii* isolates from bovine subclinical mastitis. J. Dairy Sci., 2015, 98:3613–3621.
58. Sobukawa, H., et al. *In vitro* algacide effect of disinfectants on *Prototheca zopfii* genotypes 1 and 2. J. Vet. Med. Sci., 2011, 73:1527–1529.
59. Lassa, H., **Jagielski, T.**, Malinowski, E. Effect of different heat treatments and disinfectants on the survival of *Prototheca zopfii*. Mycopathologia, 2010, 171:177-182.
60. Lagneau, P.-E., **Jagielski, T.** Heat resistance of *Prototheca* spp. in milk at pasteurization temperatures. J. Mycol. Méd., 2007, 17:148–149.
61. Melville, P. A, et al. Evaluation of the susceptibility of *Prototheca zopfii* to milk pasteurization. Mycopathologia, 1999, 146:79–82.
62. Alves, A. C., Capra, E., Morandi, S., Cremonesi, P., Pantoja, J. C., Langoni, H., de Vargas, A. P., da Costa, M. M., **Jagielski, T.**, Bolaños, C. A., Guerra, S. T., Ribeiro, M. G. *In vitro* algicidal effect of guanidine on *Prototheca zopfii* genotype 2 strains isolated from clinical and subclinical bovine mastitis. Lett. Appl. Microbiol., 2017, 64:419-423.
63. Machat, B. H. Polyhexamethylene biguanide hydrochloride: features and applications. Br. J. Env. Sci., 2016, 4:49–55.
64. **Jagielski, T.**, et al. A comparative study of the activity of iodopropynyl 1 butylcarbamate (IPBC) and amphotericin B (AMB) against *Prototheca* spp. J. Dairy Sci., 2017, 100:7435-7445.
65. Niedźwiecka, K., et al. Glutathione may have implications in the design of 3-bromopyruvate treatment protocols for both fungal and algal infections as well as multiple myeloma. Oncotarget, 2016, 7:65614-65626.
66. **Jagielski, T.**, et al. 3-bromopyruvate as an alternative option for the treatment of protothecosis. Front. Pharmacol., 2018, 9:e375.
67. Dyla, M., et al. 3-bromopyruvate: a novel antifungal agent against the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2013, 434:322–327.
68. Sweet, M. J., Singleton, I. Silver nanoparticles: a microbial perspective. Adv. Appl. Microbiol., 2011, 77:115–133.
69. Zhang, X. F., et al. Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. Int. J. Mol. Sci., 2016, 17:e1534.
70. **Jagielski, T.**, et al. The activity of silver nanoparticles against microalgae of the *Prototheca* genus. Nanomedicine, 2018, 13:1025-1036.
71. Wang, Y., et al. Antimicrobial blue light inactivation of pathogenic microbes: State of the art. Drug Resist. Updat., 2017, 33-35:1-22.
72. Anjos, C., Sabino, C., Celidonio Pogliani, F., Sellera, F., Ribeiro, M., Lincopan, N., Gargano, R., **Jagielski, T.** Algicidal effect of blue light on pathogenic *Prototheca* species. Photodiagnosis Photodyn. Ther., 2019, 26:210-213.
73. Möller, A., et al. *Prototheca zopfii* genotype 2: the causative agent of bovine protothecal mastitis? Vet. Microbiol., 2007, 120:370-374.
74. Ricchi, M., et al. Molecular characterization of *Prototheca* strains isolated from Italian dairy herds. J. Dairy Sci., 2010, 93:4625-4631.
75. Shahid, M., et al. Characterization of *Prototheca zopfii* genotypes isolated from cases of bovine mastitis and cow barns in China. Mycopathologia, 2016, 181:185-195.
76. **Jagielski, T.**, et al. Molecular characterization of Polish *Prototheca zopfii* mastitis isolates and first isolation of *Prototheca blaschkeae* in Poland. Pol. J. Vet. Sci., 2010, 13:725-729.

77. **Jagielski, T.**, et al. Genotyping of bovine *Prototheca* mastitis isolates from Poland. *Vet. Microbiol.*, 2011, 149:283-287.
78. Ahrholdt, J., Murugaiyan, J., Straubinger, R. K., **Jagielski, T.**, Roesler, U. Epidemiological analysis of worldwide bovine, canine and human clinical *Prototheca* isolates by PCR genotyping and MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping. *Med. Mycol.*, 2011, 50:234-243.
79. Hirose, N., et al. Molecular Characterization of *Prototheca* strains isolated in China revealed the first cases of protothecosis associated with *Prototheca zopfii* genotype 1. *Med. Mycol.*, 2018, 56:279-287.
80. **Jagielski, T.**, et al. *cytb* as a new genetic marker for differentiation of *Prototheca* species. *J. Clin. Microbiol.*, 2018, 56:pil:e00584-18.
81. **Jagielski, T.**, et al. An optimized method for high-quality DNA extraction from microalga *Prototheca wickerhamii* for genome sequencing. *Plant Meth.*, 2017, 13:e77.
82. Żak, I., **Jagielski, T.**, Kwiatkowski, S., Bielecki, J. *Prototheca wickerhamii* as a cause of neuroinfection in a child with congenital hydrocephalus. First case of human protothecosis in Poland. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2012, 74:186-189.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Poza 16 pracami składającymi się na osiągnięcie naukowe, w okresie 9 lat (2010-2019) byłem autorem lub współautorem łącznie 70 innych publikacji naukowych, w tym 52 publikacji oryginalnych oraz 15 publikacji poglądowych.<sup>18</sup> Choć tematyka tych opracowań jest dość rozległa i wielonurtowa, niemal wszystkie mieszczą się w dziedzinie mikrobiologii medycznej, czy też mikrobiologii chorób zakaźnych. Co więcej, swoistym zwornikiem większości prac jest zagadnienie diagnostyki molekularnej zakażeń wywoływanych przez drobnoustroje chorobotwórcze. Poniżej, przedstawiono krótko główne motywy i osiągnięcia tych prac. Przy tym, kluczem ich podziału, organizującym także porządek ich omawiania jest przedmiot badań, czyli rodzaj względnie grupa badanych drobnoustrojów patogennych.

### EPIDEMIOLOGIA I MOLEKULARNE PODSTAWY LEKOOPORNOŚCI W ZAKAŻENIACH PRĄTKOWYCH

#### PRACE ORYGINALNE:

- [1] Bakuła, Z., Javed, H., Pleń, M., Jamil, N., Tahir, Z., **Jagielski, T.** Genetic diversity of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Punjab, Pakistan. *Infect. Genet. Evol.*, 2019, pii: S1567-1348(19)30028-0.
- [2] Javed, H., Bakuła, Z., Pleń, M., Hashmi, H.J., Tahir, Z., Jamil, N., **Jagielski, T.** Evaluation of Genotype MTBDR*plus* and MTBDR*sl* assays for rapid detection of drug resistance in extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Pakistan. *Front. Microbiol.*, 2018, 9, e2265.

<sup>18</sup> Spośród tych prac, 9 (4 prace eksperymentalne i 5 prac poglądowych) zostało przygotowanych i opublikowanych w okresie przed uzyskaniem stopnia doktora (2006–2010). Prace te zaznaczono (\*).

- [3] Jagielski, T., Bakula, Z., Brzostek, A., Minias, A., Stachowiak, R., Kalita, J., Napiórkowska, A., Augustynowicz-Kopeć, E., Żaczek, A., Vasiliauskiene, E., Bielecki, J., Dziadek, J. Characterization of mutations conferring resistance to rifampicin in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2018, **62**(10), e01093-18.
- [4] Bakula, Z., Kościuch, J., Safianowska, A., Proboszcz, M., Bielecki, J., van Ingen, J., Krenke, R., Jagielski, T. Clinical, radiological and molecular features of *Mycobacterium kansasii* pulmonary disease. *Resp. Med.*, 2018, 139, 91-100.
- [5] Murugaiyan, J., Lewin, A., Kamal, E., Bakula, Z., van Ingen, J., Ulmann, V., Unzaga Barañano, M.J., Humięcka, J., Safianowska, A., Roesler, U.H., Jagielski, T. MALDI spectra database for rapid discrimination and subtyping of *Mycobacterium kansasii*. *Front. Microbiol.*, 2018, 9, e587.
- [6] Bakula, Z., Brzostek, A., Borówka, P., Żaczek, A., Szulc-Kielbik, I., Podpora, A., Parniewski, P., Strapagiel, D., Dziadek, J., Proboszcz, M., Bielecki, J., van Ingen, J., Jagielski, T. Molecular typing of *Mycobacterium kansasii* using pulsed-field gel electrophoresis and a newly designed variable-number tandem repeat analysis. *Sci. Rep.*, 2018, **8**(1), e4462.
- [7] Bakula, Z., Modrzejewska, M., Pennings, L., Proboszcz, M., Safianowska, A., Bielecki, J., van Ingen, J., Jagielski, T. Drug susceptibility profiling and genetic determinants of drug resistance in *Mycobacterium kansasii*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2018, **62**(4), pii: e01788-17.
- [8] Borówka, P., Lach, J., Bakula, Z., van Ingen, J., Safianowska, A., Brzostek, A., Dziadek, J., Strapagiel, D., Jagielski, T. Draft genome sequences of *Mycobacterium kansasii* clinical strains. *Genome Announc.*, 2017, **5**(22), pii: e00406-17.
- [9] Strapagiel, D., Borówka, P., Marciniak, B., Bakula, Z., van Ingen, J., Safianowska, A., Brzostek, A., Dziadek, J., Jagielski, T. Draft genome sequences of *Mycobacterium kansasii* strains 1010001454, 1010001458, 1010001468, 1010001493, 1010001495, and 1010001469, isolated from environmental sources. *Genome Announc.*, 2016, **4**(3), pii: e00456-16.
- [10] Bakula, Z., Modrzejewska, M., Safianowska, A., van Ingen, J., Proboszcz, M., Bielecki, J., Jagielski, T. Proposal of a new method for subtyping of *Mycobacterium kansasii* based upon PCR-restriction enzyme analysis of the *tuf* gene. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2016, **84**(4), 318-321.
- [11] Jagielski, T., Bakula, Z., Roeske, A., Kamiński, M., Napiórkowska, A., Augustynowicz-Kopeć, E., Zwolska, Z., Bielecki, J. Mutation profiling for detection of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2015, **70**(12), 3214-3221.
- [12] Bakula, Z., Napiórkowska, A., Kamiński, M., Augustynowicz-Kopeć, E., Zwolska, Z., Bielecki, J., Jagielski, T. Second-line anti-tuberculosis drug resistance and its genetic determinants in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 2015, **49**(3), 439-44.

- [13] **Jagielski, T.**, Klatt, M., Zwolska, Z., Augustynowicz-Kopeć, E. Spoligotype-defined population structure of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Eastern Poland. *Post. N. Med.*, 2015, **28**(3), 11-17.
- [14] **Jagielski, T.**, Brzostek, A., Dziadek, J., Augustynowicz-Kopeć, E., Zwolska, Z. A close-up on the epidemiology and transmission of multidrug-resistant tuberculosis in Poland. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2015, **34**(1), 41-53.
- [15] **Jagielski, T.**, Ignatowska, H., Bakula, Z., Napiórkowska, A., Augustynowicz-Kopeć, E., Zwolska, Z., Bielecki, J. Screening for streptomycin resistance-conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Poland. *PLoS ONE*, 2014, **9**(6), e100078.
- [16] **Jagielski, T.**, Bakula, Z., Roeske, K., Kamiński, M., Napiórkowska, A., Augustynowicz-Kopeć, E., Zwolska, Z., Bielecki, J. Detection of mutations associated with isoniazid resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2014, **69**(9), 2369-2375.
- [17] Bakula, Z., Napiórkowska, A., Bielecki, J., Augustynowicz-Kopeć, Zwolska, Z., **Jagielski, T.** Mutations in the *embB* gene and their association with ethambutol resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Poland. *Biomed Res. Int.*, 2013, 2013:167954.
- [18] **Jagielski, T.**, Grzeszczuk, M., Kamiński, M., Roeske, K., Napiórkowska, A., Stachowiak, R., Augustynowicz-Kopeć, E., Zwolska, Z., Bielecki, J. Identification and analysis of mutations in the *katG* gene in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Adv. Resp. Med. (d. Pneumonol. Alergol. Pol.)*, 2013, **81**(4), 298-307.
- [19] Bakula, Z., Safianowska, A., Nowacka-Mazurek, M., Bielecki, J., **Jagielski, T.** Subtyping of *Mycobacterium kansasii* by PCR-restriction enzyme analysis of the *hsp65* gene. *Biomed Res. Int.*, 2013, 2013:178725.
- [20] Hoefsloot, W., van Ingen, J., Andrejak, C., Ångeby, K., Bauriaud, R., Bemer, P., Boeree, M. J., Cacho, J., Chimara, E., Cias, R., Dasa, R., Dekhuijzen, P. N. R., Domingo, D., Drobniewski, F., Esteban, J., Fauville-Dufaux, M., Folkvardsen, D. B., Gibbons, N., Gómez-Mampaso, E., Gonzalez, R., Hoffmann, H., Hsueh, P. R., Indra, A., **Jagielski, T.**, Jamieson, F., Jankovic, M., Keane, J., Koh, W. J., Leao, S., Macedo, R., Mannsåker, T., Marras, T., Maugein, J., Milburn, H., Mlinkó, T., Morcillo, N., Morimoto, K., Papaventis, D., Palenque, E., Paez-Peña, M., Piersimoni, C., Polanová, M., Rastogi, N., Richter, E., Ruiz-Serrano, M. J., Silva, A., Simsek, H., van Soolingen, D., Szabó, N., Thomson, R., Tórtola Fernandez, M. T., Tortoli, E., Totten, S. E., Tyrrell, G., Vasankari, T., Villar, M., Walkiewicz, R., Winthrop, K., Wagner, D. for NTM-NET. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: An NTM-net collaborative study. *Eur. Resp. J.*, 2013, **42**(6), 1604-1613.
- [21] Augustynowicz-Kopeć, E., **Jagielski, T.**, Kozińska, M., Kremer, K., van Soolingen, D., Bielecki, J., Zwolska, Z. Transmission of tuberculosis within family-households. *J. Infect.*, 2012, **64**(6), 596-608.



- [22] Jagielski, T., Augustynowicz-Kopeć, E., Pawlik, K., Dziadek, J., Zwolska, Z., Bielecki, J. A two-step strategy for molecular typing of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Pol. J. Microbiol.*, 2011, **60**(3), 233-241.
- [23] Jagielski, T., Augustynowicz-Kopeć, E., Zozio, T., Rastogi, N., Zwolska, Z. Spoligotype-based comparative population structure of multidrug-resistant and isoniazid mono-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex clinical isolates in Poland. *J. Clin. Microbiol.*, 2010, **48**(11), 3899-3909.
- [24\*] Augustynowicz-Kopeć, E., Jagielski, T., Zwolska, Z. Genetic diversity of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Poland, assessed by spoligotyping. *J. Clin. Microbiol.*, 2008, **46**(12), 4041-4044.
- [25\*] Augustynowicz-Kopeć, E., Jagielski, T., Kozińska, M., Zabost, A., Klatt, M., Zwolska, Z. Molecular analysis of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates collected in central Poland. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2008, **14**(6), 605-607.
- [26\*] Augustynowicz-Kopeć, E., Kozińska, M., Zabost, A., Brzezińska, S., Anielak, M., Jagielski, T., Krawiecka, D., Grzesica, R., Szymkiewicz, W., Maciak, L., Zwolska, Z. Molecular epidemiological investigations among closely related tuberculosis patients. *Pneumonologia info*, 2007, **3**(18), 14-22.
- [27\*] Augustynowicz-Kopeć, E., Jagielski, T., Kozińska, M., Zabost, A., Zwolska, Z. Znaczenie metody spoligotyping w epidemiologicznych dochodzeniach gruźlicy. *Adv. Resp. Med.* (d. *Pneumonol. Alergol. Pol.*), 2007, **75**(1), 22-31.

#### PRACE POGLĄDOWE:

- [28] Jagielski, T., Minias, A., van Ingen, J., Rastogi, N., Brzostek, A., Żaczek, A., Dziadek, J. Methodological and clinical aspects of the molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2016, **29**(2), 239-290.
- [29] Bakula, Z., Safianowska, A., Nowacka-Mazurek, M., Bielecki, J., Jagielski, T. *Mycobacterium kansasii*: biologia patogenu oraz cechy kliniczne i epidemiologiczne zakażeń. *Post. Mikrobiol.*, 2014, **53**(3), 241-254.
- [30] Jagielski, T., van Ingen, J., Rastogi, N., Dziadek, J., Mazur, P. K., Bielecki, J. Current methods in the molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. *Biomed Res. Int.*, 2014, 2014:014:645802.
- [31] Jagielski, T., Augustynowicz-Kopeć, E., Zwolska, Z. Typowanie genetyczne prątków *Mycobacterium tuberculosis*. Przegląd ważniejszych technik badawczych (cz. II). *Pol. Merkur. Lek.*, 2010, **29**(171), 212-216.
- [32] Jagielski, T., Augustynowicz-Kopeć, E., Zwolska, Z. Typowanie genetyczne prątków *Mycobacterium tuberculosis*. Przegląd ważniejszych technik badawczych (cz. I). *Pol. Merkur. Lek.*, 2010, **29**(171), 206-211.

[33] Jagielski, T., Augustynowicz-Kopeć, E., Zwolska, Z. Epidemiologia gruźlicy lekoopornej: świat – Europa – Polska. *Wiad. Lek.*, 2010, **63**(4), 345-357.

[34] Jagielski, T., Augustynowicz-Kopeć, E., Zwolska, Z. Epidemiologia gruźlicy w perspektywie świata, Europy i Polski. *Wiad. Lek.*, 2010, **63**(3), 230-246.

#### PRACE REDAKCYJNE, LISTY:

[35] Jagielski, T., Mokrousov, I. Special Issue on Molecular aspects of mycobacterial infections. *Infect. Genet. Evol.*, 2019. doi: 10.1016/j.meegid.2019.03.014.

[36] Jagielski, T. Partnership to Fight Against TB in Central and Eastern Europe (FATE). FATE: the new partnership to Fight Against TB in Central and Eastern Europe. *Lancet Infect. Dis.*, 2017, **17**(4), 363.

[37] Jagielski, T., van Ingen, J., Rastogi, N., Dziadek, J. Recent developments in mycobacteriology. A clinical and diagnostic perspective. *Biomed Res. Int.*, 2014, 2014:813185.

Problematyce zakażeń prątkowych (tj. wywoływanych przez bakterie z rodzaju *Mycobacterium*) poświęcono ogółem 27 prac oryginalnych. Szczególne miejsce zajmują prace (18) dotyczące prątków gruźlicy (*Mycobacterium tuberculosis*), w części stanowiąc kontynuację lub rozwinięcie badań realizowanych w trakcie studium doktoranckiego. Przy tym, panuje tutaj wyraźny podział tematyczny; część prac dotyczy wykorzystania typowania genetycznego (genotypowania) prątków *M. tuberculosis* w dochodzeniach epidemiologicznych w gruźlicy [1,13,14,21-27], podczas gdy inne skupiają się na identyfikacji genetycznych markerów lekooporności prątków [2,3,11,12,15-18]. Prace pierwszej grupy miały w większości charakter pionierski, w tym sensie, że jako pierwsze podawały charakterystykę molekularną populacji prątków gruźlicy izolowanych od polskich chorych.<sup>19</sup> Różny był przy tym zasięg geograficzny i okno czasowe badania. Różnie zaawansowana była też metodyka badawcza. Kolejne prace dają właściwie przegląd wszystkich metod genotypowania prątków gruźlicy, jakie w tym czasie recypowała literatura fachowa. Najnowsze z tych prac, poświęcone transmisji gruźlicy wielolekoopornej (ang. *Multidrug-Resistant*, MDR) oraz wśród osób blisko spokrewnionych, przeprowadzono w obowiązującym do dzisiaj standardzie, włączającym kombinację metody spoligotyping oraz MIRU–VNTR (ang. *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units–Variable Number Tandem Repeat*) [14,21]. We wcześniejszych badaniach stosowano metodę spoligotyping samodzielnie lub w połączeniu z metodą IS6110-Mtb1-Mtb2 PCR, która mimo wysokiej zdolności różnicowania szczepów *M. tuberculosis*, nie przyjęła się szerzej z powodu trudności w interpretacji generowanych profili elektroforetycznych [13,22-27].<sup>20</sup> Chcąc ułatwić stosowanie tej metody, zaproponowano strategię, w której najpierw wszystkie

<sup>19</sup> Wyjątek stanowiła praca realizowana w kooperacji z University of Punjab w Lahaur (Pakistan), w której badano strukturę genetyczną prątków gruźlicy izolowanych w prowincji Pendżab (Pakistan) [1].

<sup>20</sup> Metoda spoligotyping wykrywa polimorfizm regionu DR (ang. *Direct Repeat*) w genomie prątków *M. tuberculosis* complex. Metoda MIRU–VNTR typing polega na analizie polimorfizmu w 12, 15 lub 24 minisatelitarnych *loci*, które tworzy zmienna liczba powtórzeń tego samego motywu minisatelitarnego. W metodzie IS6110-Mtb1-Mtb2 PCR oceniana jest wariantywność fragmentów DNA umiejscowionych między sekwencjami dwóch rodzajów: IS6110 oraz krótkich sekwencji bogatych w pary GC (Mtb1/2).

badane szczepy analizowane są metodą spoligotyping, a następnie tylko szczepy o jednokowych spoligotypach różnicowane są przy użyciu techniki IS6110-Mtb1-Mtb2 PCR [22].

W cyklu prac dotyczących mechanizmów lekooporności w gruźlicy, przeprowadzono analizę występowania mutacji w 22 genetycznych *loci* warunkujących stan oporności prątków gruźlicy na leki p/prątkowe I wyboru (tj. izoniazyd (INH) [11,16,18], ryfampicynę (RMP) [3] i etambutol (EMB) [17]) oraz II wyboru (tj. streptomycynę (SM) [15], aminoglikozydy i fluorochinolony [12]) zarówno w szczepach lekoopornych (mono- i wielolekoopornych), jak i lekoopornych (kontrola).<sup>21</sup> Chodziło o ustalenie stopnia specyficzności poszczególnych mutacji wobec określonego fenotypu opornościowego. Ponadto, celem tych prac było określenie wpływu wykrytych mutacji nie tylko na profil lekooporności prątków (oporność na poszczególne leki p/prątkowe), ale również na poziom lekooporności (miano oporności na poszczególne leki p/prątkowe). Rozpoznanie mutacji warunkujących stan oporności *M. tuberculosis* na leki p/prątkowe jest podstawą opracowania nowoczesnych, wysoce specyficznych i czułych testów diagnostycznych, umożliwiających wiarygodną i szybką identyfikację szczepów lekoopornych, a co za tym idzie szybkie wdrożenie odpowiedniego leczenia. Ewaluacji dwóch takich testów, komercyjnie dostępnych (GenoType MTBDR*plus*/MTBDR*sl*, Hain Lifescience), dotyczyło jedno z opracowań omawianego cyklu publikacyjnego [2].<sup>22</sup>

Ogólnie, wśród najważniejszych osiągnięć zrealizowanych w ramach powyższych badań należy wymienić:

- Wykreślenie, w wymiarze regionalnym i ogólnokrajowym, struktury genetycznej szczepów *M. tuberculosis* krążących w populacji polskich chorych na gruźlicę (pierwsze badania epidemiologiczne gruźlicy w Polsce, przeprowadzone przy pomocy technik typowania genetycznego *M. tuberculosis*) [13,24,25,27];
- Wykazanie transmisji gruźlicy wśród członków polskich rodzin (pierwsze tego typu badanie przeprowadzone przy pomocy technik typowania genetycznego *M. tuberculosis*) [21,26];
- Kompleksowa charakterystyka molekularna szczepów *M. tuberculosis* o oporności typu MDR, a także chorych wydalających te prątki (profil socjo-demograficzny i kliniczny chorych, analiza przebiegu i wyników leczenia) – największe dotychczas studium epidemiologiczne gruźlicy lekoopornej w kraju, łączące klasyczne metody mikrobiologiczne, metody molekularne oraz tradycyjny wywiad od chorych; wykazanie, po raz pierwszy w Polsce, transmisji gruźlicy typu MDR [14,22,23];
- Opisanie nowych mutacji genetycznych o potencjalnym znaczeniu dla rozwoju oporności prątków *M. tuberculosis* na 4 leki p/prątkowe (INH, RMP, EMB, SM); opracowanie na tej bazie panelu 13 mutacji do użycia w funkcji markerów lekooporności w testach diagnostycznych [3,11,15-18].

---

<sup>21</sup> Badania realizowane były we współpracy z Instytutem Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie, a finansowane ze środków przyznanych grantem, wygranym w konkursie «IUVENTUS PLUS» Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Projekt pn.: «Identyfikacja oraz analiza genetyczna mutacji warunkujących lekooporność w szczepach klinicznych *Mycobacterium tuberculosis* typu MDR»; kierownik projektu: dr Tomasz Jagielski; nr projektu: IP2011 011471).

<sup>22</sup> Badanie realizowane we współpracy z University of Punjab w Lahaur (Pakistan) i w ramach studium doktoranckiego wspólnie promowanego przeze mnie dr. Hasnain Javed'a (patrz pkt III – K1 – Załącznik 4b).



Dorobek publikacyjny dotyczący gruźlicy uzupełnia 6 artykułów poglądowych oraz 3 publikacje o charakterze redakcyjnym lub listów. Wśród prac poglądowych, 4 rekapituluje stan wiedzy w zakresie technik typowania genetycznego prątków *M. tuberculosis* oraz innych narzędzi (np. aplikacji bioinformatycznych, baz danych) użytecznych w prowadzeniu molekularnych badań epidemiologicznych w gruźlicy [28,30-32]. Dwie prace przedstawiają aktualną (w chwili publikacji manuskryptu) sytuację epidemiologiczną gruźlicy, w tym gruźlicy lekoopornej, na świecie, w Europie i w Polsce [33,34]. Wśród artykułów redakcyjnych i listów, szczególnie cenię doniesienie prezentujące założone przez mnie konsorcjum naukowo-badawcze «FATE» (ang. *Fate Against Tuberculosis in Europe*) [36].

Podobny zakres tematyczny i cele badawcze, jak w wypadku prac nt. gruźlicy, miały prace poświęcone prątkom *Mycobacterium kansasii*, stanowiącym jeden z najczęstszych w świecie czynników etiologicznych mykobakterioz, oportunistycznych zakażeń prątkowych wywoływanych przez prątki atypowe (ang. *Non-Tuberculous Mycobacteria*, NTM). Ogólnie, badania składały się na wielokierunkową analizę szczepów *M. kansasii* pochodzących od polskich chorych pulmonologicznych.<sup>23</sup> Analiza ta obejmowała szczegółowe rozpoznanie struktury genetycznej szczepów *M. kansasii*, ustalenie ich profilów lekowrażliwości oraz genetycznych determinantów oporności na leki, a także określenie profilów białkowych techniką MALDI-TOF. Istotną częścią badań było zestawienie danych o szczepach z danymi o chorych, od których szczepy te izolowano. W tym celu prześledzono wnikliwie socjodemograficzną, kliniczną i radiologiczną charakterystykę chorych.

Główne osiągnięcia omawianych badań wymieniono skrótowo poniżej:

- Opracowanie nowej metody identyfikacji typów genetycznych *M. kansasii* (I-VI) (PCR-RFLP dla genu *tuf*) [10];
- Opracowanie i ewaluacja technologii MALDI-TOF jako narzędzia do identyfikacji typów genetycznych *M. kansasii* (I-VI) [5];
- Opracowanie nowej metody (VNTR typing) różnicowania szczepów *M. kansasii* między i w obrębie typów genetycznych (I-VI) jako alternatywnego wobec analizy PFGE narzędzia w dochodzeniach epidemiologicznych [6];
- Analiza strukturalna genomów *M. kansasii* (technologia NGS) – zdefiniowanie różnic genetycznych między głównymi typami *M. kansasii* (I-VI) – implikacje filogenetyczne i taksonomiczne – rewizja statusu typów genetycznych i propozycja podziału taksonomicznego w obrębie gatunku *M. kansasii* [8,9];
- Identyfikacja potencjalnych markerów oporności *M. kansasii* na wybrane leki p/prątkowe (klarytromycyna i SM); ewaluacja metod oznaczania lekowrażliwości prątków *M. kansasii* (metoda mikrorozcieńczeń vs E-test) [7];
- Kompleksowa charakterystyka chorych na mykobakteriozę wywołaną prątkami *M. kansasii* – ocena czynników ryzyka zakażenia mykobakteryjnego – propozycja rewizji kryteriów diagnostycznych dla rozpoznania mykobakteriozy z zakażenia *M. kansasii* [4].

---

<sup>23</sup> Badania realizowane były we współpracy z Warszawskim Uniwersytetem Medycznym, a finansowane ze środków przyznanych grantem, wygranym w konkursie «LIDER» Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (Projekt pn.: «Nowy algorytm identyfikacji zakażeń *Mycobacterium kansasii*»; kierownik projektu: dr Tomasz Jagielski; nr projektu: LIDER/044/457/L-4/12/NCBR/2013). Jednocześnie badania te były, w znacznej części, wykonywane w ramach studium doktoranckiego wspólnie prowadzonego przez mnie dr Zofii Bakuley (patrz pkt III – K1 – Załącznik 4b).

Uzupełnieniem dorobku publikacyjnego w zakresie badań nad prątkami *M. kansasii* jest praca poglądowa prezentująca charakterystykę patogenu w kontekście wywoływanych przezeń zakażeń [29].

Na koniec, warto wskazać też wielośrodkowe badanie dotyczące prewalencji zakażeń prątkami atypowymi na świecie, w którym uczestniczyłem jako koordynator grupy polskiej. Jest to wciąż największe tego typu opracowanie dostępne w literaturze mykobakteriologicznej [20].

## DERMATOFITOZY – EPIDEMIOLOGIA, DIAGNOSTYKA I KAZUISTYKA KLINICZNA

### PRACE ORYGINALNE:

- [38] Witkowska, E., **Jagielski, T.**, Kamińska, A. Genus- and species-level identification of dermatophyte fungi by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2017, **192**, 285-290
- [39] Hryniewicz-Gwóźdź, A., Wojciechowska-Zdrojowy, M., Maj, J., Baran, W., **Jagielski, T.** Paradoxical reaction over a course of terbinafine treatment of *Trichophyton interdigitale* infection in a child. *JAMA Dermatol.*, 2016, **152**(3), 342-343.
- [40] Hryniewicz-Gwóźdź, A., Plomer-Niezgoda, E., Kalinowska, K., Czarnecka, A., Maj, J., **Jagielski, T.** Efficacy of fluconazole at a 400 mg dose for the treatment of onychomycosis. *Acta Derm. Venereol.*, 2014, **95**(2), 251-252.
- [41] Hryniewicz-Gwóźdź, A., Kalinowska, K., Plomer-Niezgoda, E., Bielecki, J., **Jagielski, T.** Increase of resistance to fluconazole and itraconazole in *Trichophyton rubrum* clinical isolates by sequential passages *in vitro* under drug pressure. *Mycopathologia*, 2013, **176**(1-2), 49-55.
- [42] Hryniewicz-Gwóźdź, A., **Jagielski, T.**, Kalinowska, K., Baczyńska, D., Plomer-Niezgoda, E., Bielecki, J. Stability of tandemly repetitive subelement PCR patterns in *Trichophyton rubrum* over serial passaging and with respect to drug pressure. *Mycopathologia*, 2012, **174**(5-6), 383-388.
- [43] Hryniewicz-Gwóźdź, A., Beck-Jendroscheck, V., Brasch, J., Kalinowska, K., **Jagielski, T.** *Tinea capitis* and *tinea corporis* with a severe inflammatory response due to *Trichophyton tonsurans*. *Acta Derm. Venereol.*, 2011, **91**(6), 708-710.
- [44] Hryniewicz-Gwóźdź, A., **Jagielski, T.**, Dobrowolska, A., Szepietowski, J., Baran, E. Identification and differentiation of *Trichophyton rubrum* clinical isolates using PCR-RFLP and RAPD methods. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2011, **30**(6), 727-731.
- [45] Hryniewicz-Gwóźdź, A., **Jagielski, T.**, Sadakierska-Chudy, A., Dyląg, M., Pawlik, K., Baran, E., Szepietowski, J. C. Molecular typing of *Trichophyton rubrum* clinical isolates from Poland. *Mycoses*, 2011, **54**(6), 726-736.

- [46] Kalinowska, K., Hryncewicz-Gwóźdź, A., Plomer-Niezdoda, E., Jagielski, T. Epidemiologia zakażeń grzybami dermatofitowymi w populacji dolnośląskiej w latach 2004-2008. *Mikol. Lek.*, 2010, **17**(3), 165-168.

W cyklu 9 prac dotyczących grzybów dermatofitowych przedstawiono wyniki badań z zakresu ścisłej mikrobiologii [41, 42], epidemiologii opisowej [46] i molekularnej [44, 45], diagnostyki [38] oraz klinicznej kazuistyki [39, 40, 43].<sup>24</sup> Ważne są tu szczególnie dwie prace poświęcone typowaniu genetycznemu grzybów *Trichophyton rubrum*, odpowiadających za większość grzybic powierzchniowych człowieka. Ilustrują one zmienność wewnątrzgatunkową patogenu, posługując się wynikami genotypowania szczepów *T. rubrum* dwiema metodami, tj. RAPD (ang. *Random Amplification of Polymorphic DNA*) oraz amplifikacji (PCR) dwóch *loci* o zmiennej liczbie tandemowych powtórzeń (ang. *Tandemly Repetitive Subelements*, TRS-1/2). Wskazują jednocześnie na przydatność obu technik w dochodzeniach epidemiologicznych dermatofitoz [44, 45]. Swego rodzaju korektę interpretacji wyników genotypowania w oparciu o *loci* TRS wprowadza analiza stabilności profilów TRS; dokumentuje zmianę wzoru skutkiem delekcji w izogenicznym szczepie, wyprowadzonym po wielokrotnych pasażach szczepu rodzicielskiego [42]. W innej pracy, z kolei, wykazano, że wielokrotne pasażowanie szczepów *T. rubrum* w obecności podprogowych (poniżej wartości MIC) stężeń fungistatyku (FCZ, ITZ) powoduje, że grzyby te, w istotnym odsetku (56,7–80%) nabywają oporność na te leki [41]. Oporność dermatofitów na azole jest jedną z przyczyn niepowodzeń terapii i przewlekłości zakażeń.

W osobnej pracy, po raz pierwszy, odniesieniu do dermatofitów, zbadano potencjał diagnostyczny powierzchniowo wzmocnionej spektroskopii Ramana (ang. *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*, SERS). W efekcie udało się wyznaczyć specyficzne widma spektralne dla czterech gatunków grzybów *Trichophyton*, tj. *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. interdigitale* oraz *T. tonsurans*, a także dla grzybów z gatunku *Microsporum canis* i *Epidermophyton floccosum*, dowodząc przydatności tej techniki w różnicowaniu gatunkowym dermatofitów [38].

Trzy prace mają wybitnie kliniczny charakter i opisują skuteczność pulsacyjnej terapii FCZ w leczeniu grupy 33 pacjentów z grzybicą paznokci [40], względnie podają opisy trzech ciekawych przypadków klinicznych: dwóch, o rozległej lokalizacji zmian chorobowych i silnej reakcji zapalnej, wywołanych zakażeniem *T. tonsurans* [43] oraz jeden, o etiologii *T. interdigitale*, leczony terbinafiną, która wywołała reakcję paradoksalną, podobną do reakcji Jarisch'a-Herxheimer'a [39]. We wszystkich tych trzech pracach, kluczowe znaczenie miała molekularna diagnostyka mykologiczna.

#### DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA GRZYBÓW Z RODZAJU *SCOPULARIOPSIS*

##### PRACE ORYGINALNE:

- [47] Kordalewska, M., Kalita, J., Bakula, Z., Brillowska-Dąbrowska, A., Jagielski, T. PCR-RFLP assays for species-specific identification of fungi belonging to *Scopulariopsis* and related genera. *Med. Mycol.*, 2018. doi: 10.1093/mmy/myy106.

<sup>24</sup> Wszystkie wymienione prace są efektem współpracy z Katedrą i Kliniką Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Wyniki części tych prac były włączone do rozprawy habilitacyjnej dr hab. Anity Hryncewicz-Gwóźdź.

- [48] Kordalewska, M., Jagielski, T., Brillowska-Dąbrowska A. Rapid assays for specific detection of fungi of *Scopulariopsis* and *Microascus* genera and *Scopulariopsis brevicaulis* species. *Mycopathologia*, 2016, **181**(7-8), 465-474.
- [49] Jagielski, T., Sandoval-Denis, M., Yu, J., Yao, L., Bakula, Z., Kalita, J., Skóra, M., Krzyściak, P., de Hoog, S., Guarro, J., Gene, J. Molecular taxonomy of *Scopulariopsis*-like fungi with description of new clinical and environmental species. *Fungal Biol.*, 2016, **120**(4), 586-602.
- [50] Skóra, M., Bulanda, M., Jagielski, T. *In vitro* activities of a wide panel of antifungal drugs against various *Scopulariopsis* and *Microascus* species. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2015, **59**(9), 5827-5829.
- [51] Jagielski, T., Kosim, K., Skóra, M., Macura, A. B., Bielecki, J. Identification of *Scopulariopsis* species by partial 28S rRNA gene sequence analysis. *Pol. J. Microbiol.*, 2013, **62**(3), 303-306.

#### PRACE POGLĄDOWE:

- [52] Skóra, M., Bielecki, J., Bulanda, M., Macura, A.B., Jagielski, T. Grzyby z rodzaju *Scopulariopsis* – mało znane patogeny człowieka. *Post. Mikrobiol.*, 2015, **54**(1), 44-52.

Kolejny zbiór prac konsumuje wyniki projektu<sup>25</sup> poświęconego ocenie polimorfizmu genetycznego wśród grzybów pleśniowych z rodzaju *Scopulariopsis*, stanowiących czynnik etiologiczny dermato- i onychomykoz. (Onychomykozy wywołane grzybami *Scopulariopsis* spp. należą do najczęstszych postaci pleśnic paznokci w populacji ludzkiej). Rozpoznanie różnic genetycznych między patogennymi gatunkami z rodzaju *Scopulariopsis* miało posłużyć opracowaniu nowych metod diagnostycznych umożliwiających szybkie wykrywanie zakażeń wywoływanych przez te grzyby. Wśród najważniejszych osiągnięć należy wskazać rewizję taksonomii tych grzybów, w której kluczową rolę odegrała technika MLST (ang. *Multi-Locus Sequence Typing*). Zastosowano tu układ 4 markerów, tj. genów kodujących 28S rRNA, czynnik elongacji translacji 1- $\alpha$  (*EF1- $\alpha$* ) i  $\beta$ -tubulinę (*TUB*), a także region niekodujący ITS. Na podstawie skonkatelowanych sekwencji tych *loci* wykreślono drzewo filogenetyczne, w którego rysunku wyróżniono 41 kładów gatunkowych, rozdzielonych między cztery główne rodzaje, tj. *Microascus*, *Pithoascus*, *Scopulariopsis* i nowo utworzony rodzaj *Fuscoannellis* (wszystkie to tzw. grzyby grupy *Scopulariopsis* (ang. *scopulariopsis-like fungi*)).

Ogólnie, posługując się szczepami pochodzącymi z różnych kolekcji kultur, zweryfikowano wiele oznaczeń gatunkowych (m.in. przez zastąpienie dotychczasowych nazw – innymi lub wyłączając niektóre gatunki poza obręb rodzaju *Scopulariopsis* (*Microascus*). Podano też opis 5 nowych gatunków, tj. *Microascus chinensis*, *Microascus onychoides*, *Microascus pseudolongirostris*, *Pithoascus lunatus* i *Scopulariopsis macurae*.<sup>26</sup> [49].

<sup>25</sup> Projekt pn.: «Ocena polimorfizmu genetycznego grzybów z rodzaju *Scopulariopsis* – opracowanie molekularnej metody diagnostyki patogennych szczepów *Scopulariopsis* spp.» (Projekt «IUVENTUS PLUS»); kierownik projektu: dr Tomasz Jagielski; nr projektu: IP12013 023672).

<sup>26</sup> Nazwę *Scopulariopsis macurae* nadałem dla uhonorowania polskiej mykolog, Prof. dr hab. Anny B. Macury.

W oparciu o wyniki badań molekularno-taksonomicznych, zaprojektowano metody umożliwiające szybką identyfikację grzybów *Scopulariopsis* spp.; opracowano protokoły PCR i RT-PCR wykrywające ogólnie grzyby z rodzaju *Scopulariopsis* (*Microascus*) oraz, osobno, grzyby z gatunku *S. brevicaulis* [48]; zaprojektowano też algorytm, obejmujący 5 reakcji PCR–RFLP (2 – dla genu *COX1*; 3 – dla genu *TUB*) i zapewniający identyfikację 21 różnych gatunków grzybów z „grupy *Scopulariopsis*” (z rodzajów: *Microascus*, *Pithoascus*, *Scopulariopsis* i *Fuscoannellis*) [47].

Ważną częścią badań było też ustalenie profilów wrażliwości grzybów „grupy *Scopulariopsis*” na leki p/grzybicze, najczęściej stosowane w praktyce klinicznej. W ślad za doniesieniami o wysokim potencjale lekooporności wśród tych grzybów, w pracy własnej wykazano brak lub niską ich wrażliwość na AMB, 5-FC, cyklopiroks oraz leki azolowe. Najwyższą aktywność odnotowano dla terbinafiny i kaspofunginy [50].

Wśród prac poświęconych grzybom *Scopulariopsis* spp. jest też praca pogładowa, stanowiąca największe dotąd opracowanie na temat tych grzybów w piśmiennictwie polskojęzycznym [52].

## ■ DIAGNOSTYKA I KAZUISTYKA MYKOLOGICZNA

### PRACE ORYGINALNE:

- [53] Jankowski, M., **Jagielski, T.**, Misiak, G., Czajkowski, R. Hand dermatitis with *Hanseniaspora uvarum* as a plausible causative agent. *Adv. Dermatol. Allergol.*, 2018, **35**(6), 641-643.
- [54] Dyląg, M., Hryncewicz-Gwóźdź, A., **Jagielski, T.** Onychomycosis due to *Arthrimum arundinis* – first case report. *Acta Derm. Venereol.*, 2017, **97**(7), 860-861.
- [55] Witkowska, E., **Jagielski, T.**, Kowalska, A., Waluk, J., Hryncewicz-Gwóźdź, A., Kamińska, A. Detection and identification of human fungal pathogens using surface-enhanced Raman spectroscopy and principal component analysis. *Anal. Meth.*, 2016, **8**, 8427-8434.
- [56] Kordalewska, M., Brillowska-Dąbrowska, A., **Jagielski, T.**, Dworecka-Kaszak, B. PCR and real-time PCR assays to detect fungi of *Alternaria alternata* species. *Acta Biochim. Pol.*, 2015, **62**(4), 707-712.
- [57] **Jagielski, T.**, Żak, I., Tyrak, J., Bryk, A. First probable case of subcutaneous infection due to *Truncatella angustata*. A new fungal pathogen of man? *J. Clin. Microbiol.*, 2015, **53**(6), 1961-1964.
- [58] **Jagielski, T.**, Rup, E., Ziółkowska, A., Roeske, K., Macura, A. B., Bielecki, J. Distribution of *Malassezia* species on the skin of patients with atopic dermatitis, psoriasis, and healthy volunteers, assessed by conventional and molecular identification methods. *BMC Dermatol.*, 2014, **14**(1), e3.
- [59] Pindycka-Piaszczyńska, M., Krzyściak, P., Piaszczyński, M., Cieślik, S., Januszewski, K., Izdebska-Straszak, G., Jarzab, J., de Hoog, S., **Jagielski, T.** Chromoblastomycosis as an endemic disease in temperate Europe. First confirmed case and review of the literature. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2013, **33**(3), 391-398.



#### PRACE POGLĄDOWE:

- [60] Rup, E., Jagielski, T., Macura, A. B., Bielecki, J. Charakterystyka grzybów z rodzaju *Malassezia*. II. Aspekty kliniczne. *Post. Mikrobiol.*, 2013, **52**(3), 307-314.
- [61] Jagielski, T., Rup, E., Macura, A. B., Bielecki, J. Charakterystyka grzybów z rodzaju *Malassezia*. I. Aspekty mikrobiologiczne i immunologiczne. *Post. Mikrobiol.*, 2013, **52**(3), 295-305.

Prace prezentowane w tej części dorobku publikacyjnego osadzone są w problematyce diagnostyki i kazuistyki mykologicznej. O ile dwie z nich mają charakter metodyczny, proponując nowe rozwiązania technologiczne o potencjalnym zastosowaniu w diagnostyce różnicowej grzybów [55,56], cztery inne to klasyczne opisy przypadków z wyraźnie eksponowaną częścią diagnostyczną [53,54,57,59].

Praca Witkowskiej i wsp. wskazuje na przydatność techniki SERS do identyfikacji grzybów chorobotwórczych, reprezentujących 4 stosunkowo odległe rodzaje, tj. *Aspergillus*, *Candida*, *Scopulariopsis* i *Trichophyton* [55]. Z kolei w pracy Kordalewskiej i wsp., proponowane są protokoły PCR i RT-PCR wykrywające grzyby z gatunku *Alternaria alternata*, głównego przedstawiciela rodzaju *Alternaria*, współodpowiedzialnego za przypadki feohyfomykozy u ludzi [56].

W 3 publikacjach kazuistycznych opisane są przypadki grzybic wywołanych przez gatunki dotąd uważane jako saprotroficzne, rzadziej fitopatogenne; chodzi tu o drożdżaki *Hanseniaspora uvarum* oraz grzyby strzępkowe *Arthrinium arundinis* i *Truncatella angustata* [53,54,57]. W innej pracy przedstawiono przypadek chromoblastomykozy, niezwykle rzadko spotykanej grzybicy na gruncie krajowym. Opisany przypadek stanowi czwarty w historii polskiej kazuistyki. Jednocześnie jest pierwszym odnotowanym w Europie Środkowo-Wschodniej (klimatu umiarkowanego) przypadkiem chromoblastomykozy wywołanej zakażeniem *Fonsecaea monophora*. Gatunek ten od innego, znacznie częstszego, gatunku *Fonsecaea pedrosoi* można odróżnić jedynie na podstawie badania molekularnego (w pracy własnej: rybotypowanie) [59].

W osobnej pracy przedstawione są wyniki badania nad składem gatunkowym grzybów *Malassezia* spp., izolowanych ze skóry osób zdrowych oraz pacjentów z objawami atopowego zapalenia skóry i łuszczycy. Badanie to było jednym z pierwszych w Polsce, gdzie identyfikację gatunkową grzybów *Malassezia* spp. prowadzono przy użyciu metod typowania genetycznego (rybotypowanie), obok metod konwencjonalnych [58]. Drożdżakom *Malassezia* spp. poświęcona jest też dwuczęściowa praca poglądowa, stanowiąca najpełniejsze jak dotąd opracowanie dotyczące tych grzybów w piśmiennictwie rodzimym [60,61].

#### MISCELLANEA

#### PRACE ORYGINALNE:

- [62] Roeske, K., Stachowiak, R., Jagielski, T., Kaminski, M., Bielecki, J. Delivery of chicken egg ovalbumin to dendritic cells by listeriolysin O-secreting vegetative *Bacillus subtilis*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2018, **28**(1), 122-135.
- [63] Stachowiak, R., Jagielski, T., Roeske, K., Osińska, O., Gunerka, P., Bielecki, J. Lmo0171, a novel internalin-like protein, determines cell morphology of *Listeria monocytogenes* and its ability to invade human cells. *Curr. Microbiol.*, 2015, **70**(2), 267-274.

- [64] Stachowiak, R., Łyżniak, M., Grabowska, M., Roeske, K., **Jagielski, T.**, Bielecki, J., Budziszewska, B. K., Hoser, G., Kawiak, J. Cytotoxicity of purified listeriolysin O on mouse and human leukocytes and leukaemia cells. *BMC Biotechnol.*, 2014, **14**(1), e77.
- [65] **Jagielski, T.**, Puacz, E., Lisowski, A., Siedlecki, P., Dudziak, W., Międzobrodzki, J., Krukowski, H. Antimicrobial susceptibility profiling and genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Poland. *J. Dairy Sci.*, 2014, **97**(10), 6122-6128.

#### PRACE POGLĄDOWE:

- [66\*] Szafron, Ł., **Jagielski, T.**, Dzikowska, A. Białka z rodziny MADS – kombinatoryczne regulatory transkrypcji u grzybów, zwierząt i roślin. *Post. Biochem.*, 2009, **55**(1), 54-65.
- [67\*] **Jagielski, T.**, Osińska, O., Bielecki, J. Molekularne determinanty wirulencji *Listeria monocytogenes*. II. Czynniki wirulencji uczestniczące w wewnątrzkomórkowym etapie patogenezы: listeriolizyna O (LLO), fosfolipaza B (PlcB), metaloproteaza (Mpl), fosfolipaza A (PlcA) i białko ActA. *Post. Mikrobiol.*, 2006, **45**(4), 303-313.
- [68\*] Osińska, O., **Jagielski, T.**, Bielecki, J. Molekularne determinanty wirulencji *Listeria monocytogenes*. I. Patogeneza listeryjna. Czynniki wirulencji: białka powierzchniowe uczestniczące w adhezji do komórek gospodarza. *Post. Mikrobiol.*, 2006, **45**(3), 209-220.
- [69\*] **Jagielski, T.**, Lagneau, P.-E. Protothecosis. A pseudofungal infection. *J. Mycol. Méd.*, 2007, **17**(4), 261-270.
- [70\*] **Jagielski, T.** Protothecosis – etiologia, obraz kliniczny, terapia i diagnostyka laboratoryjna. *Mikol. Lek.*, 2006, **13**(4), 307-314.

Ostatnia grupa artykułów zamykająca dorobek publikacyjny uzupełniający osiągnięcie naukowe, prezentuje dość szerokie spectrum tematyczne i dotyka problematyki, która sytuuje się obecnie poza głównym nurtem moich dociekań badawczych. Wyniki trzech spośród czterech prac eksperymentalnych sięgają moich wczesnych badań nad właściwościami cytotoksycznymi i immunogennymi listeriolizyny O, głównego czynnika wirulencji *Listeria monocytogenes*. W pracy Roeske i wsp., z powodzeniem użyto niesporującego, rekombinowanego szczepu *Bacillus subtilis*, eksprymującego listeryjną hemolizynę, jako swoistego wektora do indukcji odpowiedzi komórkowej przeciwko owoalbuminie [62]. Z kolei w pracy Stachowiaka i wsp. wykazano aktywność preparatu oczyszczonej listeriolizyny na mysich i ludzkich leukocytach. Głównym osiągnięciem było tutaj opracowanie nowej metody oczyszczania listeriolizyny, zwiększającej stabilność preparatu [64].

W innej pracy, skonstruowano szczep *L. monocytogenes* z mutacją w genie *Imo0171*. Analiza fenotypowa (ocena mikromorfologii, testy inwazyjności) szczepu pozwoliła uznać, że produktem genu *Imo0171* jest białko z rodziny internalin, zaangażowane w metabolizm ściany komórkowej oraz adhezję do powierzchni komórek gospodarza [63].

Osobna praca poświęcona jest szczegółowej charakterystyce szczepów *Staphylococcus aureus*, izolowanych z przypadków bydłowego mastitis. Przedstawiono tu wyniki typowania genetycznego oraz oznaczeń lekowrażliwości dla 80 szczepów gronkowcowych. Wskazano

na rzadkość zjawiska lekooporności (dotyczyło tylko penicyliny, spośród 10 badanych antybiotyków) oraz wysoce klonalną strukturę genetyczną badanej populacji bakteryjnej. Wśród szczepów *S. aureus* izolowanych od krów z różnych gospodarstw stwierdzono wyraźną dominację jednego typu genetycznego, dowodząc między-stadnej transmisji [65].

Wśród prac poglądowych wymienić należy dwu-artykułowe opracowanie dotyczące molekularnych determinantów listeryjnej patogenezы [67,68], a także pracę omawiającą charakterystykę tzw. białek MADS, stanowiących liczną rodzinę czynników transkrypcyjnych współzawiających podstawowymi procesami metabolicznymi oraz transdukcją sygnału w komórkach eukariotycznych [66].

## 6. Dane bibliometryczne

- ❖ Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w których ukazały się wszystkie publikacje habilitanta<sup>27</sup> – **234,510**
- ❖ Sumaryczna liczba punktów MNI SW za wszystkie publikacje habilitanta – **2130**
- ❖ Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w których ukazały się wszystkie publikacje habilitanta (z wyj. artykułów redakcyjnych i listów)<sup>27</sup> – **205,238**
- ❖ Sumaryczna liczba punktów MNI SW za wszystkie publikacje habilitanta (z wyj. artykułów redakcyjnych i listów) – **2020**
- ❖ Liczba cytowań wszystkich publikacji habilitanta na dzień 15.04.2019 r. (wg Web of Science) – **746**
- ❖ Indeks Hirsch'a habilitanta (wg Web of Science) – **13**



<sup>27</sup> Zgodnie z rokiem publikacji; w wypadku prac opublikowanych w latach 2018 i 2019 zastosowano ostatnią, dostępną w bazach wartość współczynnika, tj. za rok 2017 (IF<sub>2017</sub>).