

Załącznik nr 2 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

Jacek Karamon  
Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych  
Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy  
w Puławach



# **A U T O R E F E R A T**

Puławy, 2017

### 1. Imię i Nazwisko.

Jacek Karamon

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

2006 – **doktor nauk weterynaryjnych** - Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach (Tytuł rozprawy doktorskiej: „Rola *Isospora suis* jako czynnika etiologicznego biegunki u prosiąt ssących oraz wykrywanie tego pierwotniaka we wczesnej fazie inwazji”)

2001 - **lekarz weterynarii** - Akademia Rolnicza w Lublinie

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

2006 – **adiunkt** – Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

2004 – **asystent** - Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

2001 – **specjalista inżynierijno- techniczny** - Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

### 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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

#### a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,

Rozprzestrzenienie inwazji *Echinococcus multilocularis* u zwierząt w Polsce oraz analiza zróżnicowania genetycznego tego pasożyta.

#### b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy)

**H-1: Karamon J, Sroka J., Cencek T.:** Limit of detection of sedimentation and counting technique (SCT) for *Echinococcus multilocularis* diagnosis, estimated under experimental conditions. *Experimental Parasitology* 2010, 124, 244-246.

IF<sub>2010</sub>=1,869; MNiSW<sub>2010</sub>=27pkt.; liczba cytowań (WoS Core Collection) – 13

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części badań laboratoryjnych, opracowaniu wyników i przygotowaniu pracy do druku. Mój udział procentowy szacuję na: 70%*

**H-2: Karamon J, Sroka J, Cencek T, Kochanowski M, Dąbrowska J:** Efficacy of intestinal scraping technique (IST) in *Echinococcus multilocularis* diagnosis – estimation of the limit of detection and comparison with sedimentation and counting technique (SCT). *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. 2012, 56, 535–538

IF<sub>2012</sub>=0,377; MNiSW<sub>2012</sub>=20 pkt.; liczba cytowań (WoS Core Collection) – 2

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części badań laboratoryjnych, opracowaniu wyników i przygotowaniu pracy do druku. Mój udział procentowy szacuję na: 70%*

**H-3: Karamon J:** Detection of *Echinococcus multilocularis* in faeces by nested PCR with the use of diluted DNA samples. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 2014, 17, 79–83

IF<sub>2014</sub>=0,604; MNiSW<sub>2014</sub>=20 pkt.; liczba cytowań (WoS Core Collection) – 2

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, Wykonaniu badań laboratoryjnych, syntezie, opracowaniu wyników i przygotowaniu pracy do druku. Mój udział procentowy szacuję na: 100%*

**H-4: Karamon J, Kochanowski M, Sroka J, Cencek T, Rozycki M, Chmurzynska E, Bilaska-Zajac E:** The prevalence of *Echinococcus multilocularis* in red foxes in Poland-current results (2009-2013). *Parasitology Research* 2014, 113, 317-322

IF<sub>2014</sub>=2,381; MNiSW<sub>2014</sub>=30 pkt.; liczba cytowań (WoS Core Collection) – 16

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części badań laboratoryjnych, opracowaniu wyników i przygotowaniu pracy do druku. Mój udział procentowy szacuję na: 70%*

**H-5: Karamon J, Kochanowski M, Dąbrowska J, Sroka J, Różycki M, Bilaska-Zajac E, Cencek T:** Dynamics of *Echinococcus multilocularis* infection in red fox populations with high and low prevalence of this parasite in Poland (2007-2014) *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 2015, 59, 213-217

IF<sub>2015</sub>=0,468; MNiSW<sub>2015</sub>=15pkt.; liczba cytowań (WoS Core Collection) – 3

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części badań laboratoryjnych, opracowaniu wyników i przygotowaniu pracy do druku. Mój udział procentowy szacuję na: 70%*

**H-6: Karamon J, Samorek-Pieróg M, Kochanowski M, Dąbrowska J, Sroka J, Gołąb E, Umhang G, Cencek T:** First detection of *Echinococcus multilocularis* in dogs in a highly endemic area of Poland. *Folia Parasitologica*, 2016, 63, 018.

IF<sub>2015</sub>=1,271; MNiSW<sub>2016</sub>=20pkt.; liczba cytowań (WoS Core Collection) – 1

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części badań laboratoryjnych, syntezie, opracowaniu wyników i przygotowaniu pracy do druku. Mój udział procentowy szacuję na: 70%*

**H-7: Karamon J, Sroka J, Cencek T:** The first detection of *Echinococcus multilocularis* in slaughtered pigs in Poland. *Veterinary Parasitology* 2012, 185, 327-329.

IF<sub>2012</sub>=2,381; MNiSW<sub>2012</sub>=40 pkt.; liczba cytowań (WoS Core Collection) – 8

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części badań laboratoryjnych, opracowaniu wyników i przygotowaniu pracy do druku. Mój udział procentowy szacuję na: 75%*

**H-8: Karamon J, Stojecki K, Samorek-Pieróg M, Bilaska-Zajac E, Różycki M, Chmurzyńska E, Sroka J, Zdybel J, Cencek T:** Genetic diversity of *Echinococcus multilocularis* in red foxes in Poland: the first report of a haplotype of probable Asian origin. *Folia Parasitologica*, 2017, 64, 007

IF<sub>2015</sub>=1,271; MNiSW<sub>2016</sub>=20 pkt.; liczba cytowań (WoS Core Collection) – 0

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części badań laboratoryjnych, opracowaniu wyników i przygotowaniu pracy do druku. Mój udział procentowy szacuję na: 70%*

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

Echinokokoza alweolarna (bąblowica wielojamowa, alweokokoza, ang. alveolar echinococcosis, AE) jest jedną z najgroźniejszych pasożytniczych chorób odzwierzęcych. Przyczyną alweokokozy ludzi jest rozwijająca się forma larwalna tasiemca z rodziny Taenidae - *Echinococcus multilocularis*.

W cyklu rozwojowym *Echinococcus multilocularis* rolę typowego żywiciela ostatecznego, w którego organizmie zachodzi rozmnażanie płciowe tego pasożyta, pełni lis rudy (*Vulpes vulpes*). Rozwój form dojrzałych stwierdzano także w jelitach u innych gatunków zwierząt np. u jenotów, lisów polarnych, wilków, szakali, a także psów i kotów. W jelicie cienkim żywiciela ostatecznego rozwijają się formy dojrzałe pasożyta. Tasiemce te charakteryzują się stosunkowo małymi rozmiarami (długość: 1,5 -4,5mm). Ciało składa się z 4-5 segmentów. Skoleks zaopatrzony jest w 4 przyssawki i podwójny wieniec haków. Inwazja może być bardzo intensywna (do kilkuset tysięcy tasiemców u jednego lisa). U dojrzałych osobników ostatni człon zawierający macicę wypełnioną inwazyjnymi jajami odrywa się i zostaje wydalony wraz z kałem. Jaja pozostające w środowisku zewnętrznym stanowią źródło zarażenia dla żywicieli pośrednich (Eckert et al. 2001). Za typowych żywicieli pośrednich uważa się są gryzonie takie jak norniki, karczowniki, nornice, piżmaki (rodzaje: *Microtus*, *Arvicola*, *Ondatra*, *Myodes*). Są to gatunki, u których najczęściej stwierdzano larwy tego tasiemca, jednak dostępne badania są dość fragmentaryczne i lista żywicieli pośrednich na pewno jest zdecydowanie dłuższa (Oksanen et al. 2016). Żywiciel pośredni zaraża się poprzez połknięcie jaj *E. multilocularis*. Uwolniona w przewodzie pokarmowym onkosfera wędruje wraz z krwią do narządów wewnętrznych (najczęściej do wątroby) i tam przekształca się w formę larwalną - bąblowca. Powstaje wielopęcherzykowa forma (nieograniczona

zewnątrzną torebką łącznotkankową) wewnątrz której powstają protoskoleksy. Po połknięciu tkanek zawierających larwy pasożyta, w jelicie żywiciela ostatecznego protoskoleksy przekształcają się w postacię dojrzałe tasiemców (Eckert et al. 2001; Oksanen et al. 2016).

Człowiek, w cyklu rozwojowym tego pasożyta, pełni funkcję niespecyficznego żywiciela pośredniego. W organizmie człowieka larwa *E. multilocularis* rozwija się najczęściej w wątrobie, gdzie tworzy początkowo małe, kilkumilimetrowe ogniska, które mogą z czasem powiększać swoje rozmiary (do ok. 15-20 cm). Larwa może rozprzestrzeniać się po organizmie poprzez infiltrację narządów sąsiadujących oraz poprzez przerzuty do tkanek bardziej oddalonych za pośrednictwem krwi i limfy. Rozwój alweokokozy u człowieka jest długotrwały i związany z powolnym rozwojem larwy – bezobjawowy okres inkubacji choroby może trwać od 5 do 15 lat. Dlatego choroba najczęściej jest późno diagnozowana, a u nieleczonych pacjentów najczęściej śmiertelna. Terapia wiąże się z długotrwałym przyjmowaniem leków przeciw pasożytniczych lub radykalnym zabiegiem chirurgicznym (Eckert et al. 2001; Nahorski et al., 2013).

Ze względu na poważne zagrożenie dla zdrowia i życia ludzi według opinii Komitetu Naukowego ds. Środków Weterynaryjnych dotyczących Zdrowia Publicznego bąblowica jest jednym z priorytetów w zakresie ochrony zdrowia publicznego. W Polsce (tak jak w całej Unii Europejskiej) bąblowica i jej czynniki chorobotwórcze znajdują się wśród 8 chorób odzwierzęcych, które ustawowo podlegają obowiązkowi monitorowania.

Podobnie jak dla innych żywicieli pośrednich źródłem zarażenia dla ludzi są inwazyjne jaja *E. multilocularis* obecne w środowisku zewnętrznym. Człowiek może zarazić się poprzez połknięcie ich wraz z zanieczyszczoną żywnością (warzywa, owoce runa leśnego) lub bezpośrednio ze środowiska (zanieczyszczona jajami gleba, brak podstawowej higieny osobistej). Przeprowadzone w ostatnich latach w Polsce badania wykazały obecność materiału genetycznego *E. multilocularis* w glebie, a także na owocach, warzywach i grzybach (Szostakowska et al. 2014; Lass et al., 2015). Jednak trudno jest ocenić sytuację epidemiologiczną w szerszym zakresie (np. na terenie kraju czy województwa) badając tylko elementy środowiska czy produkty spożywcze - głównie ze względu na punktowy i nierównomierny sposób zanieczyszczenia. Jak wynika z cyklu rozwojowego, jaja tego pasożyta rozprzestrzeniane są w otoczeniu wraz z odchodami żywicieli ostatecznych. Ocena prewalencji w populacjach tych zwierząt pozwala pośrednio ocenić ryzyko zarażenia dla ludzi. Powszechnie uważa się, że w Europie gatunkiem odpowiedzialnym za gros zanieczyszczenia środowiska inwazyjnymi jajami *E. multilocularis*, jest lis rudy (Kapel et al., 2006; Oksanen et al. 2016). Dlatego też te zwierzęta stanowią zasadniczy cel badań monitoringowych. W Europie w ostatnich dziesięcioleciach można zaobserwować wzrost ekstensywności tej inwazji u lisów w rejonach endemicznych (Oksanen et al. 2016), a także ekspansję tego pasożyta na tereny, na których dotychczas nie był stwierdzany. Od końca ubiegłego wieku obszar występowania tego tasiemca u zwierząt w Europie rozszerzył się z terenu obejmującego kilka krajów: Szwajcarię, część Niemiec, południowo-wschodnią Francję, Austrię (tzw. „core region”) na kilkanaście nowych krajów, w tym także Polskę. W Polsce pierwszy przypadek inwazji *E. multilocularis* u lisa pozyskanego na terenie obecnego województwa pomorskiego został opisany w 1995 roku (Malczewski et al., 1995). Od tamtego czasu przeprowadzono szereg badań w wybranych regionach Polski

potwierdzając obecność tego pasożyta w naszym kraju (Borecka et al. 2007, 2008; Malczewski et al. 2008; Pacoń et al., 2006; Ramisz et al., 1997). Badania te były jednak fragmentaryczne i w obliczu dynamicznie zmieniającej się sytuacji epidemiologicznej echinokokozy nie dawały pełnej i aktualnej wiedzy na temat tej inwazji.

W ostatnich latach większy nacisk kładzie się także na rolę domowych zwierząt mięsożernych jako źródła inwazji dla człowieka. Doświadczalnie udowodniono, że w jelitach psów i kotów zachodzi pełny rozwój tego tasiemca – powstają dojrzałe formy i wytwarzane są jaja (choć w przypadku kotów liczba wydalanych z kałem jaj i czas ich wydalania jest krótszy) (Kapel et al., 2006). W niektórych krajach (np. Niemcy, Litwa, Słowacja) stwierdzano niewielki odsetek zarażonych psów lub kotów (0,3 - 3%) w zależności od rejonu badań i grupy zwierząt poddanych badaniu (Antolova et al., 2009; Bruzinskaite et al., 2009; Dyachenko et al., 2008). Jednak ze względu na bliski i częsty bezpośredni kontakt psów i kotów z człowiekiem oraz duże możliwości przemieszczania się (podróże razem z właścicielem) mogą one stanowić istotne źródło zarażenia, którego nie należy bagatelizować.

Rozpoznanie inwazji u żywicieli pośrednich związane jest zasadniczo z mikroskopowym badaniem tkanek pozyskanych w trakcie sekcji, które jednak wymaga potwierdzenia (identyfikacji gatunkowej pasożyta) przy użyciu metod molekularnych. Rozpoznanie inwazji *E. multilocularis* u żywicieli ostatecznych opiera się na badaniach pośmiertnych (badanie treści jelit metodami mikroskopowymi w celu wykrycia tasiemców) oraz przyżyciowych (badanie kału w kierunku wykrycia DNA lub antygenów pasożyta) (Eckert et al. 2001; OIE, 2008). Pewnym problemem w interpretacji wyników badań u zwierząt mięsożernych jest niedoprecyzowana skuteczność stosowanych metod diagnostycznych. Szczególnie chodzi tutaj o metody podstawowe (mikroskopowe badanie jelit), które stanowią bazę dla oceny skuteczności innych, bardziej zaawansowanych procedur. Z kolei badanie kału za pomocą metod molekularnych napotyka na trudności związane między innymi z inhibicją reakcji PCR, co także wymaga od badacza doboru optymalnej dla własnych celów metody izolacji i protokołu badania.

W ostatnich latach duża część uwagi skierowana jest na poszerzenie wiedzy dotyczącej zróżnicowania genetycznego w obrębie gatunku *E. multilocularis*. Nieliczne jeszcze badania wskazują na dużą zależność pomiędzy występowaniem poszczególnych typów genetycznych, a rozmieszczeniem geograficznym tych pasożytów, co jest związane, między innymi, ze specyficznymi drogami przemieszczania się ich żywicieli (Knapp et al. 2009, Nakao et al. 2009). Obecnie na bazie badań filogenetycznych kształtują się pewne teorie tłumaczące drogi rozprzestrzeniania się inwazji *E. multilocularis* w Europie. Z jednej strony zróżnicowanie genetyczne *E. multilocularis* w Europie jest tłumaczone migracją typu „mainland-island” czyli migracji pasożytów wraz z żywicielami z historycznego europejskiego centrum tej inwazji (zlokalizowanego w Szwajcarii i Południowych Niemczech) na obszary peryferyjne, m.in. także w kierunku wschodnim (Knapp et al. 2009). Z drugiej strony analizy prowadzone w Azji i Europie (Nakao et al. 2009, Konyaev et al. 2013) sugerują rozprzestrzenianie się genotypów azjatyckich ze wschodniej Azji w kierunku zachodnim. Wydaje się, że dokładna analiza odpowiednio licznej populacji *E. multilocularis*

w Europie wschodniej może odpowiedzieć na pytanie, jak daleko na zachód sięga dystrybucja azjatyckiej populacji tego pasożyta.

Główne cele badań własnych, których wyniki przedstawiono w prezentowanym jednotematycznym cyklu publikacji, były następujące:

- I. **Ocena przydatności wybranych metod diagnostycznych do badań nad występowaniem *E. multilocularis* u żywicieli ostatecznych**
- II. **Ocena występowania *E. multilocularis* u żywicieli ostatecznych oraz u zwierząt rzeźnych w Polsce jako wskaźnik zagrożenia dla ludzi**
- III. **Analiza zróżnicowania genetycznego *E. multilocularis* u lisów w Polsce**

#### **Ad. I. Ocena przydatności wybranych metod diagnostycznych do badań nad występowaniem *E. multilocularis* u żywicieli ostatecznych**

Ocena zagrożenia ze strony *E. multilocularis* dla zdrowia i życia ludzi opiera się w dużej mierze na badaniach monitoringowych żywicieli ostatecznych. Rozpoznawanie inwazji u tych zwierząt bazuje na badaniu zawartości jelit w celu wykrycia dojrzałych form tasiemców *E. multilocularis*, materiału genetycznego lub antygenów tego pasożyta. W badaniach monitoringowych przeprowadzanych na dużą skalę u głównego żywiciela ostatecznego, którym jest lis, ze względu na specyfikę pozyskania próbek (odstrzał) nadal najbardziej popularne są metody pośmiertne polegające na mikroskopowym badaniu treści jelit w celu wykrycia tasiemców *E. multilocularis*. Powszechne użycie tych metod związane jest z ich relatywnie dużą czułością a także niskimi kosztami wykonania badania. Międzynarodowa Organizację Zdrowia Zwierząt (O.I.E) rekomenduje kilka metod tego typu. Wśród nich najbardziej efektywną metodą jest metoda sedymentacyjna (sedimentation and counting technique, SCT). Metoda ta po raz pierwszy opisana przez Rausch'a i wsp. (Rausch et al. 1990). została ostatecznie zmodyfikowana przez Hofer'a i wsp. (Hofer et al. 2000). Co najistotniejsze, metoda SCT jest uznawana z „złoty standard” dla wszystkich innych (nie tylko mikroskopowych, ale także molekularnych i immunologicznych) metod rozpoznawania inwazji *Echinococcus* spp. u żywicieli ostatecznych. Skuteczność innych metod oceniana jest poprzez odniesienie do wyników uzyskanych metodą SCT. Jednak jak dotąd skuteczność samej metody SCT nie została prawidłowo oceniona. Czułość tej metody opisywano jako „zbliżoną do 100%”, a limit detekcji określano jako zdolność do wykrywania „pojedynczych tasiemców” jedynie na podstawie teoretycznych założeń i przypuszczeń (Eckert et al. 2003). Do określenia podstawowej efektywności metody (jaką minimalną liczbę pasożytów można za pomocą niej wykryć) konieczne jest badanie próbek o znanej zawartości tasiemców, co jest niemożliwe do przeprowadzenia przy użyciu jelit naturalnie zarażonych zwierząt. Dlatego też celem badań opisanych w artykule [H1] [Karamon et al. *Limit of detection of sedimentation and counting technique (SCT) for Echinococcus multilocularis diagnosis, estimated under experimental conditions. Exp Parasitol 2010, 124, 244-246*] była ocena granicy wykrywalności metody SCT przy użyciu próbek doświadczalnie wzbogaconych

znaną liczbą tasiemców *E. multilocularis*. Przygotowano 40 próbek zawierających 2, 5, 10, 30 tasiemców *E. multilocularis* (10 próbek na każdym poziomie wzbogacenia) i przebadano metodą SCT. Wszystkie próbki zawierające 30 tasiemców zostały określone jako pozytywne, 60% pozytywnych wyników uzyskano podczas badania próbek z 10 tasiemcami, 40% dla próbek z 5 i 30% dla 2 tasiemców w próbce. Granicę wykrywalności ( $LD_{50}$ ) określano jako najmniejszą liczbę tasiemców w próbce, która może być wykryta w co najmniej 50% powtórzeń. Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki za granicę wykrywalności metody SCT uznano poziom 10 tasiemców na próbkę. Wyniki te potwierdziły relatywnie wysoką skuteczność metody. Jednak, co istotne, pokazały także ograniczenia metody, którą do tej pory teoretycznie uznawano za 100% skuteczną. Należy ponadto zaznaczyć, że pomimo próby odtworzenia naturalnych warunków przeprowadzenia metody, nasze badania są modelem eksperymentalnym, który w pełni nie odzwierciedla badania jelit pochodzących od naturalnie zarażonych zwierząt. W rzeczywistych warunkach tasiemce *E. multilocularis* są przytwierdzone do błony śluzowej jelita, co zapewne zmniejsza jeszcze skuteczność odzyskiwania ich podczas badania w porównaniu z próbkami sztucznie wzbogaconymi. Z tego powodu należy przypuszczać, że rzeczywista granica wykrywalności jest jeszcze wyższa (gorsza) niż uzyskana w naszym doświadczeniu. Ponadto, średnia liczba wykrytych tasiemców w poszczególnych próbkach była kilkukrotnie niższa niż rzeczywista liczba dodanych. Jest to prawdopodobnie związane głównie ze stratami podczas postępowania z próbką w trakcie wykonywania procedury. Konkludując, w przedstawionych badaniach granica wykrywalności metody SCT została określona po raz pierwszy. Wykazane w tej pracy ograniczenia metody uznawanej za „złoty standard” powinny być brane pod uwagę w analizie wyników badań szczególnie w populacjach charakteryzujących się niską intensywności inwazji.

Inną metodą zalecaną przez O.I.E. do monitorowania sytuacji epidemiologicznej u żywicieli ostatecznych *E. multilocularis* jest metoda badania zeskrabin z błony śluzowej jelita (intestinal scraping technique, IST). Jest to metoda charakteryzująca się niższą czułością niż SCT, ale jednocześnie jest mniej pracochłonna, dlatego stosunkowo często jest używana przy szerokich programach monitoringowych, gdzie badana jest duża liczba próbek. W badaniach opisanych w pracy [H2] [*Karamon et al. Efficacy of intestinal scraping technique (IST) in Echinococcus multilocularis diagnosis – estimation of the limit of detection and comparison with sedimentation and counting technique (SCT). Bul Vet Inst Pulawy 2012, 56, 535–538*] analogicznie jak w badaniach dotyczących SCT wyznaczono granicę wykrywalności tej metody za pomocą próbek o znanej zawartości tasiemców *E. multilocularis*. Użyto następujących poziomów wzbogacenia próbek: 10, 30, 60, 90 tasiemców na próbkę. Granicę wykrywalności ( $LOD_{50}$ ) oszacowano na 30 tasiemców na próbkę (tj. w 50% próbek na tym poziomie wzbogacenia wykryto tasiemce *E. multilocularis*). Dodatkowo przeprowadzono porównanie skuteczności metody IST z metodą SCT poprzez równoległe badanie jelit pochodzących od 127 lisów. Wykazano dużą różnicę w skuteczności wykrywania inwazji *E. multilocularis* pomiędzy dwiema metodami. Mianowicie, metodą SCT wykazano 8 dodatnich próbek, natomiast metodą IST tylko 2. Ponadto, zarówno w badaniu próbek domieszkowanych jak i naturalnie zarażonych wykazano wielokrotnie niższą liczbę tasiemców wykrytych za pomocą IST w stosunku do rzeczywistej ich liczby w próbce lub



określonej za pomocą metody SCT. Liczba „odzyskanych” z próbki tasiemców stanowiła zaledwie kilka procent (2-3%) ich rzeczywistej zawartości. Uzyskane wyniki pokazują, że zastosowanie metody IST może znacząco zaniżać wyniki badań monitoringowych. Użycie tej metody wydaje się szczególnie ryzykowne w przypadku badań prowadzonych w rejonach o bardzo niskiej prevalencji pasożytów.

Metody pośmiertnego badania żywicieli ostatecznych, mają głównie zastosowane do prowadzenia monitoringu u zwierząt wolnożyjących (lisy lub jenoty). Są jednak sytuacje, gdzie konieczne jest przeprowadzenie badań przyżyciowo (np. badanie prowadzone w populacji psów). Dobrą alternatywą wydaje się być badanie kału. Wykrycie samych jaj tasiemców poprzez badanie mikroskopowe jest mało specyficzne ponieważ, morfologicznie jaja *E. multilocularis* są niemal identyczne z jajami tasiemców z całej rodziny Taenidae, do której należą także liczne i często spotykane u mięsożernych tasiemce z rodzaju *Taenia*. Dlatego do badań tego typu stosuje się metody do wykrywania koproantygenów lub różne odmiany metody PCR do wykrywania materiału genetycznego *E. multilocularis*. Na efektywność metod molekularnych znaczący wpływ mają obecne często w kale inhibitory reakcji PCR, które mogą powodować reakcje fałszywie negatywne. Jedną z najpopularniejszych w tym zakresie metod PCR jest metoda do bezpośredniego wykrywania DNA w kale (copro-DNA) Celem badań opisanych w pracy [H3] [Karamon. *Detection of Echinococcus multilocularis in faeces by nested PCR with the use of diluted DNA samples. Polish Journal of Veterinary Sciences 2014, 17, 79–83*] był wybór optymalnego wariantu badania kału metodą PCR w kierunku wykrycia DNA *E. multilocularis*, który zminimalizowałby ryzyko uzyskania wyników fałszywie ujemnych. W przedstawionych badaniach zdecydowano się na wyeliminowanie inhibicji poprzez zmniejszenie koncentracji inhibitorów stosując optymalne rozcieńczenie DNA. Do badań użyto 35 jelit lisów, spośród których metodą SCT inwazję *E. multilocularis* potwierdzono w 18 próbkach. Z każdego jelita z prostnicy pobierano kał do badań molekularnych. Z części jelit pobrano większą ilość kału co umożliwiło przeprowadzenie badania metodą flotacji w kierunku jaj tasiemców z rodziny Taenidae. Badania molekularne obejmowały 3 różne metody izolacji DNA z kału: dwie metody z użyciem zestawu dedykowanego do izolacji z kału (różniące się głównie objętością próbki) oraz jedna metoda dedykowana do izolacji DNA z tkanek. DNA izolowane każdym z trzech zestawów badano metodą PCR w 6 różnych wariantach koncentracji (nierozcieńczone i rozcieńczone 1/2,5; 1/5; 1/10; 1/20; 1/40). W pracy zastosowano stosunkowo popularną w badaniach monitoringowych metodę nested PCR opisaną wcześniej przez Dinkel i wsp. (Dinkel et al, 1998) z własnymi modyfikacjami dotyczącymi składników mieszaniny reakcyjnej i warunków amplifikacji. Tak jak można się było spodziewać, najlepsze rezultaty (więcej wyników pozytywnych) uzyskano przy badaniu DNA izolowanego przy użyciu zestawów dedykowanych do kału (nieco więcej w wariacie do większej objętość próbki). Natomiast badanie próbek DNA w różnych rozcieńczeniach wykazało wyraźnie niekorzystny wpływ inhibitorów zawartych w kale na efektywność reakcji PCR. Szczególnie dobrze obrazują to wyniki uzyskane przy badaniu DNA izolowanego metodą dedykowaną do tkanek: aż w 67% próbek dodatnich w tym wariacie produkt specyficzny pojawił się dopiero w kolejnych rozcieńczeniach DNA – przy nierozcieńczonym DNA uzyskiwano wynik negatywny. Należy zaznaczyć, że zjawisko to (blokowanie reakcji

w nierozcieńczonej matrycy) obserwowano także (choć na mniejszą skalę) podczas badania DNA izolowanego zestawami dedykowanymi do kału. Rozcieńczenia matrycy wydaje się dobrym sposobem na zapobieżenie znacznemu odsetkowi fałszywie ujemnych wyników. Inną metodą stosowaną w molekularnej diagnostyce echinokokozy u żywicieli ostatecznych jest pozyskiwanie materiału z jaj tasiemców uprzednio wyizolowanych z kału z pomocą flotacji – co w skuteczny sposób eliminuje inhibitory z matrycy (Al-Sabi et al., 2007). Jednak, biorąc pod uwagę ograniczenia metody flotacji w wykrywaniu jaj tasiemców oraz obecność niedojrzałych form *E. multilocularis* w jelicie, istnieje tutaj niebezpieczeństwo wyeliminowania pewnej liczby potencjalnie dodatnich próbek na wstępnym etapie flotacji. W naszych badaniach, w których część próbek kału badano dodatkowo metodą flotacji, jaja tasiemców stwierdzono tylko w ok. 50% próbek pochodzących z jelit, gdzie stwierdzano *E. multilocularis* metodą SCT. Wskazuje to na możliwość znacznego zaniżenia rzeczywistego odsetka zwierząt zarażonych w danej populacji, gdyby do badań molekularnych stosowana była wstępna selekcja próbek (tj. kwalifikacja na podstawie badania flotacyjnego). Podsumowując, badania wykazały, że użycie dodatkowo rozcieńczonego izolatu może skutecznie zminimalizować uzyskanie fałszywie ujemnych wyników w nested PCR w kierunku *E. multilocularis*. Za optymalny wariant do zastosowania w rutynowych badaniach uznano użycie matrycy nierozcieńczonej oraz rozcieńczonej 1:10 (przy zastosowaniu efektywnej izolacji DNA metodą dedykowaną do próbek kału)

## **Ad. II. Ocena występowania *E. multilocularis* u żywicieli ostatecznych oraz u zwierząt rzeźnych w Polsce jako wskaźnik zagrożenia dla ludzi**

Bezpośrednim źródłem inwazji *E. multilocularis* dla człowieka jest środowisko lub żywność zanieczyszczona inwazyjnymi jajami tego tasiemca. Głównym siewcą jaj *E. multilocularis*, jak wspomniano, jest lis rudy. Wynika to z wysokiej podatności lisów na zarażenie tym pasożytem, zwykle dużego zagęszczenia ich populacji oraz co za tym idzie wysokiej intensywności i ekstensywności inwazji w porównaniu do innych żywicieli ostatecznych. W Europie nie stwierdzono regionów gdzie *E. multilocularis* wykrywany byłby u innych żywicieli ostatecznych przy jednoczesnym braku tej inwazji u żyjących na tym obszarze lisów (Oksanen et al. 2016). Dlatego też w wielu krajach prowadzone są badania monitoringowe w populacjach lisów, w celu oceny sytuacji epidemiologicznej. Wiedza o odsetku zarażonych lisów oraz intensywności inwazji w danym regionie pozwala wnioskować o ryzyku zarażenia dla ludzi. Jak już wspomniano we wstępie, w Polsce pierwszy przypadek *E. multilocularis* u lisa stwierdzono w 1994 roku (Malczewski et al. 1995) i od tamtej pory kilkakrotnie prowadzono w kraju badania, jednak dotyczyły one tylko wybranych regionów kraju (Borecka et al. 2007, 2008; Malczewski et al. 2008; Pacoń et al., 2006; Ramisz et al., 1997). Ponadto zmieniająca się dynamicznie sytuacja dotycząca tej inwazji wymagała aktualizacji dotychczasowej wiedzy o występowaniu pasożyta. Skłoniło nas to do podjęcia badań obejmujących obszar całego kraju opisanych w publikacji [H4] [Karamon et al. *The prevalence of Echinococcus multilocularis in red foxes in Poland-current results (2009-2013). Parasitol Res 2014, 113, 317-322*]. W ramach badań pozyskano

1546 lisów z obszaru 15 województw w latach 2009-2013. Jelita cienkie lisów badane były w kierunku wykrycia inwazji *E. multilocularis* metodą SCT. Tasiemce z tego gatunku stwierdzono u 16,5% badanych lisów. Wyniki wskazują na bardzo nierównomierne rozmieszczenie inwazji na terenie kraju. Daje się zauważyć pewna zależność, mianowicie tereny o wysokiej ekstensywności *E. multilocularis* u lisów znajdują się we wschodniej połowie kraju, natomiast te o niskim odsetku zarażonych lisów - w zachodniej. Najwyższą ekstensywność inwazji notuje się w województwach warmińsko-mazurskim i podkarpackim, gdzie ok. 50% lisów było zarażonych tym tasiemcem. Wysoki odsetek lisów pozytywnych (ok. 30%) notowany był także w województwach mazowieckim, podlaskim, małopolskim i stosunkowo wysoki w woj. świętokrzyskim i lubelskim (kilkanaście procent). Sytuacja w zachodniej połowie Polski przedstawia się zgoła inaczej – ekstensywność na tych terenach jest zdecydowanie niższa i nie przekracza kilku procent. Porównanie aktualnych rezultatów z wynikami uzyskanymi w ciągu ostatnich 20 lat przez innych autorów wskazuje na dynamiczny wzrost odsetka zarażonych lisów (Borecka et al. 2007, 2008; Malczewski et al. 2008; Pacoń et al., 2006; Ramisz et al., 1997). Wzrost ten nastąpił tylko w części terytorium Polski (wschodnia połowa). Ponadto daje się zauważyć, że wyraźny wzrost ekstensywności rozpoczął się w pierwszych latach XXI w. W przeciwieństwie do wschodniej części kraju, w zachodniej połowie wzrost ekstensywności nie nastąpił – stosunkowo niski poziom zarażenia utrzymuje się w tych województwach przez okres ostatnich 15-20 lat. Trudno jest na tym etapie badań wnioskować ostatecznie, co jest główną przyczyną nierównomiernego rozmieszczenia inwazji *E. multilocularis* u lisów w Polsce. Wzrost ekstensywności tej inwazji u lisów, który miał miejsce w ostatnich dziesięcioleciach nie tylko w Polsce, ale także w wielu krajach europejskich, najczęściej jest tłumaczony przez gwałtowny wzrost liczebności populacji tych zwierząt, co z kolei silnie koreluje z wprowadzonymi w tym czasie szeroko-zakrojonymi programami szczepień przeciw wściekliznie (Borecka et al. 2008). Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że pomimo, że w Polsce w ciągu ostatnich kilkunastu lat populacja lisów wzrosła około czterokrotnie na obszarze całego kraju, to wzrost odsetka zarażonych tym tasiemcem lisów obserwuje się tylko we wschodniej połowie Polski – na zachodzie utrzymuje się jeszcze stosunkowo niski poziom inwazji.

Można założyć, że zwiększenie liczebności populacji lisów jest z pewnością bardzo istotnym czynnikiem, jednak nie determinuje bezwzględnie wystąpienia wysokiej ekstensywności inwazji *E. multilocularis* u tych zwierząt. Niektórzy badacze wskazują na przykład powiązanie pomiędzy odsetkiem zarażonych lisów a średnimi rocznymi temperaturami, opadami i innymi geoklimatycznymi czynnikami (jest to głównie związane z warunkami sprzyjającymi przetrwaniu inwazyjnych jaj w środowisku) (Miterpakova et al. 2006). Takiej ścisłej zależności nie obserwujemy jednak w Polsce – np.: część województw z niską ekstensywnością inwazji tego pasożyta u lisów (zachodniopomorskie, dolnośląskie, pomorskie) charakteryzuje się stosunkowo wysokimi średnimi rocznymi opadami, wyższymi niż w niektórych województwach o wysokiej ekstensywności (mazowieckie, lubelskie, podlaskie). Warunki klimatyczne zdecydowanie pełnią kluczową rolę w ograniczeniu rozpowszechnienia *E. multilocularis* w skali świata (północna półkula) lub kontynentu

(w Europie południowa granica przebiega mniej więcej przez północne Włochy, Węgry i Rumunię (Casulli et al., 2005, 2010). Jednak w skali jednego regionu lub kraju (np. Polski) zlokalizowanego w całości w rejonie endemicznym, warunki klimatyczne wydają się być jedynie jednym z wielu elementów wpływających na częstość występowania *E. multilocularis* u lisów. Należy przypuszczać, że nie ma uniwersalnej odpowiedzi na pytanie, jaki czynnik bezpośrednio decyduje o kształtowaniu się poziomu ekstensywności tej inwazji. Jest to najprawdopodobniej zespół wielu elementów (biologicznych, geoklimatycznych) występujących i oddziałujących równocześnie w złożonych układach wzajemnych powiązań, specyficznie dla konkretnego regionu.

Ostatnie badania własne wskazują jednak, że również w województwach, w których do tej pory notowano niską ekstensywność inwazji tasiemców bąblowcowych wzrost populacji pasożytów staje się coraz bardziej dynamiczny. Opisano to w kolejnej publikacji wchodzącej w skład prezentowanego cyklu [H5] [Karamon et al. *Dynamics of Echinococcus multilocularis* infection in red fox populations with high and low prevalence of this parasite in Poland (2007-2014) *Bul Vet Inst Pulawy*, 2015, 59, 213-217]. Badania przeprowadzono w wybranych regionach Polski, charakteryzujących się niską, średnią oraz wysoką prevalencją inwazji. Wyniki porównano z wynikami badań przeprowadzonych na tych samych obszarach kilka lat wcześniej (4-5 lat). Wykazano stabilną sytuację epizootyczną w rejonach o wysokiej i średniej prevalencji. Natomiast, w województwie opolskim (gdzie jeszcze w 2010 roku nie stwierdzano w ogóle zarażonych lisów) w 2013 r. nastąpił statystycznie istotny wzrost prevalencji *E. multilocularis*. Co więcej, jak wykazują niepublikowane jeszcze badania własne, tendencja wzrostowa obserwowana była w tym rejonie w kolejnych latach. W ostatnich dziesięcioleciach w Europie także obserwowano rozszerzanie się strefy występowania *E. multilocularis* oraz wzrost prevalencji tego pasożyta u lisów. Wyraźnie to uwidoczniły badania prowadzone w Niemczech. W ciągu 15-20 lat odsetek zarażonych lisów wzrósł od 12 do 40% w środkowych Niemczech (Staubach et al. 2011) i od 12 do 20% w północnych Niemczech (Denzin et al. 2014). Podobne rezultaty uzyskano we Francji (Combes et al. 2012). Natomiast analiza statystyczna wyników badań w Holandii wykazała, że pasożyt ten rozszerza swój zasięg w kierunku północnym z szybkością 2,7 km na rok (Takumi et al. 2008). Należy podkreślić, że analiza dynamiki inwazji prezentowana w naszej pracy bazowała na porównaniu aktualnych i wcześniejszych wyników uzyskanych przy użyciu tej samej, zwalidowanej, metody (SCT), przez ten sam zespół badawczy, co gwarantuje wiarygodność analizy. Wiadomo, że metody w diagnostyce echinokokozy lisów różnią się znacznie skutecznością, co często nie pozwala na precyzyjne porównanie wyników uzyskanych różnymi technikami.

Wyniki uzyskane w naszych badaniach mogą wskazywać na początek wzrostu prevalencji *E. multilocularis* w zachodniej połowie Polski - charakteryzującej się dotychczas niskim odsetkiem zarażonych lisów. To przesunięcie w czasie pomiędzy częścią wschodnią i zachodnią Polski przemawia za logistycznym charakterem krzywej wzrostu populacji pasożyta, warunkowanej liczebnością populacji lisów.

Pomimo, że lis jest głównym żywicielem ostatecznym *E. multilocularis*, to innym bardzo istotnym źródłem inwazyjnych jaj stwarzających zagrożenie dla człowieka są psy.

Dzieje się tak głównie ze względu na ich bliski kontakt z człowiekiem i jego bezpośrednim otoczeniem. Ponadto rola psów jako potencjalnych żywicieli ostatecznych *E. multilocularis* wzrasta wraz z rozwojem globalizacji i łatwości przemieszczania się na duże odległości. Stwarza to nowe możliwości rozprzestrzeniania się tej pasożytozy na rejony, do których przeniesienie inwazji za pośrednictwem żywicieli wolnożyjących jest praktycznie niemożliwe (np. na kraje wyspiarskie). Wychodząc naprzeciw temu zagrożeniu komisja WE wydała rozporządzenie (nr 1152/2011), które reguluje zasady wwożenia psów do krajów uznanych za wolne od tej inwazji (np. uszczegóławia termin obowiązkowego odrobaczenia i rodzaj środków przeciworobaczych). Rozporządzenie określa również warunki uznania kraju za wolny od tej inwazji. Na dzień dzisiejszy warunki te spełniają cztery państwa członkowskie: Irlandia, Wielka Brytania, Malta i Finlandia. W Polsce jak dotąd nie potwierdzono obecności tych tasiemców u psów - jedyne badania prowadzone w tym kierunku kilkanaście lat temu dały wynik negatywny (Machnicka et al. 2002). Dlatego też zdecydowano się przeprowadzić badania dotyczące występowania *E. multilocularis* u psów w rejonie endemicznym [H6] [Karamon et al. *First detection of Echinococcus multilocularis in dogs in a highly endemic area of Poland. Folia Parasitol, 2016, 63, 018*]. Do badań prowadzonych w okresie od marca do maja 2015 r. pozyskano 148 próbek kału psów wiejskich pochodzących z czterech powiatów województwa podkarpackiego. Próbkę pobierane przez lekarzy weterynarii w ciągu 48 godzin zamrażano i przesyłano do laboratorium PIWet-PIB w Puławach. Właściciele psów wypełniali także kwestionariusz dotyczący m.in. odrobaczenia, i zachowań związanych z polowaniem na gryzonie. Z próbek izolowano DNA za pomocą zestawu dedykowanego do kału, a następnie badano zmodyfikowaną metodą nested PCR (Dinkel 1998) w kierunku *E. multilocularis*, zmodyfikowaną metodą multiplex PCR (Trachsel et al. 2007) w kierunku *E. multilocularis* i *Taenia* spp., oraz zmodyfikowaną metodą PCR (wg. Abassi et al. 2003) w kierunku *E. granulosus*. W celu zminimalizowania potencjalnego wpływu inhibitorów każda próbka DNA była badana techniką PCR w dwóch wariantach: nierozcieńczona oraz rozcieńczona 1:10. Ponadto przeprowadzono badania kału metodą flotacji w kierunku wykrycia jaj i oocyst innych pasożytów. Badania wykazały w kale obecność specyficznego DNA *E. multilocularis* u dwóch psów (zarówno metodą nested PCR jak i multiplex PCR). Analiza sekwencji amplikonów i porównanie z bazą GenBank potwierdziły, że w obydwu przypadkach mieliśmy do czynienia z *E. multilocularis*. Jest to pierwszy potwierdzony przypadek tej inwazji u psów w Polsce. Stosunkowo niska prevalencja (1,4%) koreluje z wynikami uzyskiwanymi w podobnych badaniach w Europie (od 0,24% do 2,8%) (Dyachenko et al. 2008, Antolova et al., 2009, Umhang et al. 2014). Należy podkreślić, że wykrycie specyficznego DNA u jednego z badanych psów było możliwe dzięki zastosowaniu procedury badania dodatkowo rozcieńczonych próbek DNA (opisanej wcześniej [H3]). Mianowicie, wynik pozytywny uzyskano tutaj tylko w próbce rozcieńczonej 1:10. Prawdopodobnie w próbce nierozcieńczonej doszło do inhibicji reakcji PCR. Na uwagę zasługuje fakt, że jeden z dwóch *E. multilocularis*-pozytywnych psów wydalal jaja Taenidae. Ponieważ w tej próbce nie stwierdzono DNA *Taenia* spp. można założyć, że były to jaja *E. multilocularis*. Wskazuje to na okres patentny inwazji i istnienie bezpośredniego zagrożenia dla właścicieli psa.

Metodą multiplex PCR i sekwencjonowaniem potwierdzono ponadto obecność innych tasiemców: u 9 psów - *Taenia* spp. oraz u jednego - *Mesocestoides litteratus*. Nie stwierdzono wyników pozytywnych w kierunku *E. granulosus*. Badania koproskopowe wykazały w próbkach obecność form rozwojowych następujących pasożytów: *Toxocara* spp. (14,9%), *Toxascaris leonina* (2,0%), *Trichuris/Capillaria* (17,6%), *Cystoisospora* spp. (4,1%) oraz tasiemców z rodziny Taenidae 2,7%. Biorąc pod uwagę zarówno wyniki PCR jaki i flotację, łącznie inwazje helmintów stwierdzono u 28% psów (w tym u 8% tasiemce). Co zaskakuje, nie uzyskano istotnej statystycznie różnicy w zarobaczeniu pomiędzy grupą psów odrobaczanych i nieodrobaczonych (analizowano wszystkie helminty razem, a także tasiemce oddzielenie). Różnica nie pojawiła się nawet wtedy, gdy do analizy użyto tylko psów odrobaczanych w ciągu ostatnich 3 miesięcy. Jednak okazuje się, że nie stoi to w sprzeczności z wynikami innych autorów, gdzie także nie obserwowano różnic lub różnice były bardzo niewielkie (Sager et al. 2006, Umhang et al. 2012). Podsumowując, w przedstawionych badaniach po raz pierwszy w Polsce wykazano obecność *E. multilocularis* u psów. Pomimo niskiej prevalencji obecność tego tasiemca u psów stanowi potencjalnie duże zagrożenie dla człowieka.

Oprócz specyficznych żywicieli pośrednich (gryzonie) jajami *E. multilocularis* mogą zarazić się także inne gatunki ssaków, u których najczęściej nie występuje pełny rozwój larwy i stanowią one zazwyczaj „ślepą uliczkę” cyklu rozwojowego. Takie organizmy określane są mianem żywicieli przypadkowych lub aberracyjnych. Do tej grupy, oprócz człowieka, można zaliczyć także innych nietypowych żywicieli pośrednich, u których stwierdzano formy larwalne tego tasiemca (np. dziki, świnie, konie). Szczególnie interesujące z punktu widzenia ryzyka zarażenia ludzi, jest stwierdzenie form larwalnych u zwierząt gospodarskich. Nie pełnią one wprawdzie istotnej roli w transmisji tej inwazji, jednak stwierdzenie *E. multilocularis* w ich tkankach stanowi pewien rodzaj wskaźnika zanieczyszczenia najbliższego środowiska człowieka (tzw. środowiska synantropijnego) jajami tego tasiemca. W pracy [H7] [Karamon et al. *The first detection of Echinococcus multilocularis in slaughtered pigs in Poland. Vet Parasitol 2012, 185, 327-329*] przedstawiono pierwszy przypadek wykrycia form larwalnych *E. multilocularis* u świń w Polsce. Badania prowadzono w ramach projektu dotyczącego identyfikacji form larwalnych tasiemców u świń (szczególnie nietypowych – nierozpoznawalnych technikami mikroskopowymi). Do badań opisanych w tej publikacji wykorzystano tylko te próbki, które nie zostały zidentyfikowane jako *Echinococcus granulosus* we wstępnym etapie. Łącznie przebadano 256 fragmentów wątrób świń. Próbkę po izolacji DNA poddawano analizie molekularnej. Zastosowano zmodyfikowaną metodę nested PCR (Dinkel et al. 1998), którą wykonywano w dwóch etapach. W pierwszym etapie (odpowiedzialnym za amplifikację fragmentu charakterystycznego dla całej rodziny Taenidae) przebadano wszystkie próbki. Natomiast w drugim etapie (specyficznym dla *E. multilocularis*) badano tylko produkty pozytywne w pierwszym etapie. W wyniku przeprowadzonych badań w pierwszym etapie (Taenidae) wykazano 5 pozytywnych próbek, spośród których w drugim etapie 3 zidentyfikowano jako *E. multilocularis* (przynależność gatunkową potwierdziła analiza sekwencji uzyskanych produktów). Wszystkie próbki, z których wyizolowano materiał genetyczny *E. multilocularis* były to widoczne na

powierzchni wątroby guzkowate, białawe formy (o wymiarach od 2 do 6 mm) zagłębione częściowo w mięszu narządu. Podobne zmiany opisano wcześniej u świń w Japonii i Niemczech (Kimura et al. 2010, Sydler et al. 1998), a także u dzików w Niemczech (Pfister et al. 1993). Natomiast porównanie wyglądu zmian stwierdzonych w naszym badaniu z wynikami eksperymentalnego zarażenia świń (Deplazes et al. 2005) sugeruje, że opisane przez nas przypadki dotyczą zwierząt z niską specyficzną odpowiedzią immunologiczną na tę inwazję. Podsumowując, wykrycie larwalnych form *E. multilocularis* u świń wskazuje na obecność inwazyjnych jaj w otoczeniu tych zwierząt (w ściółce, w karmie, na wybiegu zanieczyszczonym kałem lisów lub psów). Jest to kolejny dowód, że ryzyko zarażenia ludzi nie jest związane tylko ze środowiskiem leśnym lub polnym, ale także z bezpośrednim otoczeniem człowieka, jakim są gospodarstwa rolne.

### **III. Analiza zróżnicowania genetycznego *E. multilocularis* u lisów w Polsce**

Nieliczne jak dotąd badania filogenetyczne prowadzone w Europie i na świecie wskazują na stosunkowo duże zróżnicowanie genetyczne gatunku *E. multilocularis*, które związane jest głównie z migracjami żywicieli tego pasożyta na przestrzeni ostatnich tysięcy lat. Badania prowadzone w Europie wskazują na historyczne centrum występowania tego tasiemca (rejon obejmujący m.in. Szwajcarię i południowe Niemcy), z którego inwazja rozprzestrzeniła się w Europie w kierunku zachodnim, północnym a także wschodnim (Knapp et al. 2008). Natomiast badania prowadzone w Azji sugerują przemieszczanie się odmiennych grup genetycznych tego pasożyta ze wschodnich krańców tego kontynentu na zachód, w kierunku Europy (Nakao et al. 2009). Uzupełnienie wiedzy dotyczącej kształtowania się zmienności genetycznej w Europie, zwłaszcza w kontekście wpływu na nią genotypów azjatyckich, wymaga dokładniejszych badań w rejonie wschodniej i centralnej Europy. Polska, ze swoim położeniem geograficznym i stosunkowo wysoką prevalencją *E. multilocularis* u lisów jest bardzo interesującym obszarem do przeprowadzenia takich badań. Dlatego też, dysponując znaczącą kolekcją tasiemców *E. multilocularis* izolowanych wcześniej od lisów pochodzących z różnych obszarów Polski, zdecydowałem się podjąć badania nad zróżnicowaniem genetycznym tego pasożyta. Wyniki badań zawarłem w publikacji [H8] [Karamon J et al. *Genetic diversity of Echinococcus multilocularis in red foxes in Poland: the first report of a haplotype of probable Asian origin. Folia Parasitologica, 2017, 64, 007*].

Do badań użyto 83 dojrzałych form tasiemców *E. multilocularis* pozyskanych z jelit lisów pochodzących ze wszystkich województw Polski odstrzelonych w latach 2009-2014. Tasiemce izolowano podczas badania jelit metodą SCT i konserwowano w 70% etanolu. Przed izolacją DNA pojedyncze tasiemce płukano w roztworze fizjologicznym. Za pomocą metody PCR opisanej przez Nakao et al. (2009) amplifikowano 3 geny mitochondrialne: gen cytochromu b (cob), podjednostki 2 dehydrogenazy NADH (nad2) i podjednostki 1 oksydazy cytochromu c (cox1). Uzyskane produkty sekwencjonowano. Analizę filogenetyczną uzyskanych sekwencji wykonano łącznie dla wszystkich genów oraz oddzielnie dla każdego genu - porównując z referencyjnymi sekwencjami z różnych lokalizacji zdeponowanymi

w GenBanku. Bazując na analizie wspólnej genów wyodrębniono 15 haplotypów (EmPL1-EmPL15) spośród badanych polskich izolatów *E. multilocularis*. Zdecydowana większość izolatów została zgrupowana w kładzie europejskim, natomiast jeden (EmPL9) został zaklasyfikowany do grupy haplotypów azjatyckich. Haplotyp ten wykazuje największe podobieństwo do haplotypów zidentyfikowanych w próbkach pochodzących z Kazachstanu i Japonii. Ponadto, izolaty należące do tego haplotypu w analizie genu *cox1* okazały się także bardzo podobne do próbek pochodzących z Rosji i Chin. Haplotyp EmPL9 stwierdzany był w naszych badaniach tylko w północno-wschodniej Polsce i jak dotychczas jest najdalej wysuniętym na zachód Europy haplotypem należącym do kładu azjatyckiego (jedyne dotychczas opisane w Europie przypadki z tej grupy to izolaty pozyskane z europejskiej części Rosji - ok. 1400 km na wschód od granic Polski) (Konyaev et al. 2013). Dominujący w Polsce haplotyp EmPL1 (reprezentowany przez 39% wszystkich izolatów) stwierdzany był w znaczącej przewadze w północnej, północno-wschodniej i centralnej Polsce. Jest on bardzo podobny do haplotypów zidentyfikowanych w Estonii, natomiast nie wykazuje bliskiego podobieństwa do innych haplotypów izolowanych wcześniej z obszaru Europy zachodniej i południowej-wschodniej. Z kolei na południu kraju zidentyfikowano haplotypy blisko spokrewnione z izolatami wykrytymi wcześniej za południową granicą Polski (Austria, Słowacja). Ponadto, ciekawe położenie geograficzne drugiego co do liczebności haplotypu EmPL4 (oraz innego, mniej liczniejszego EmPL10) wraz z lokalizacją w analizie filogenetycznej sugeruje, że mogą być one pewnego rodzaju haplotypami przejściowymi pomiędzy dominującym haplotypem EmPL1 charakterystycznym dla północno-wschodniej Polski (jak i północno-wschodniej Europy - Estonia) i haplotypami południowej i zachodniej Europy. Istnieją przypuszczenia, że rozdzielenie się kłędów *E. multilocularis* europejskiego i azjatyckiego nastąpiło w trakcie ostatniego zlodowacenia (ok. 60000-37000 lat temu). Podczas tego okresu zwierzęta, w tym także żywicieli *E. multilocularis*, przemieszczały się do cieplejszych obszarów (refugiów), gdzie pozostawały w pewnej izolacji ok. 10000 lat. Po ociepleniu klimatu następowała rekolonizacja opuszczonych obszarów. Europę zasiedlały zwierzęta wędrujące z południowych refugiów kontynentu, przynosząc także zróżnicowanie genetyczne swoich pasożytów. Natomiast, azjatyckie haplotypy zostały prawdopodobnie rozprzestrzenione w Azji poprzez lisy wędrujące na zachód z refugiów zlokalizowanych we wschodniej Syberii (Nakao et al. 2009). Biorąc pod uwagę te hipotezy, można przypuszczać, że stwierdzony w Polsce haplotyp azjatycki pojawił się na tych terenach razem z populacją lisów rozszerzającą swój zakres występowania z Azji w kierunku zachodnim. Z kolei fakt, że jest on jedynym haplotypem z tego kładu stwierdzonym w Polsce - pozostałe 14 należy do kładu europejskiego – może świadczyć o stosunkowo niedawnym przeniesieniu populacji azjatyckiej na te tereny. Podsumowując, wyniki badań pozwoliły na ocenę zróżnicowania genetycznego populacji tasieńców *E. multilocularis* na terenie Polski. Ponadto, wykazano, że na obszarze Polski dochodzi do swobodnego mieszania się i przenikania zasięgu występowania haplotypów *E. multilocularis* pochodzących z Europy Zachodniej z haplotypami mającymi swoje korzenie w Azji.



## Osiągnięcia:

- Na podstawie badania próbek o znanej zawartości tasiemców po raz pierwszy określono granicę wykrywalności dla podstawowych metod diagnostycznych dotyczących wykrywania inwazji *E. multilocularis* u żywicieli ostatecznych (w tym metody uznawanej za złoty standard), a także zoptymalizowano metodę nested PCR do badania kału w tym kierunku.
- Przeprowadzono szerokie badania nad występowaniem *E. multilocularis* u lisów w Polsce, które dostarczyły aktualnych danych dotyczących prewalencji tego pasożyta w naszym kraju. Stwierdzono nierównomierne rozmieszczenie inwazji u lisów na terenie Polski – w części wschodniej w niektórych województwach odsetek zwierząt zarażonych sięgał 50% natomiast w województwach zachodnich tylko kilka procent. Zaobserwowano także dynamiczny wzrost odsetka zarażonych lisów na terenach o niskiej prewalencji.
- Po raz pierwszy w Polsce stwierdzono inwazję *E. multilocularis* u psów - obecność tego tasiemca u tych zwierząt stanowi zagrożenie dla człowieka. Ponadto, także po raz pierwszy w Polsce zanotowano przypadki wystąpienia form larwalnych *E. multilocularis* u świń – przypadki te stanowią swego rodzaju wskaźnik zanieczyszczenia inwazyjnymi jajami tego pasożyta środowiska w otoczeniu człowieka.
- Na podstawie analizy sekwencji trzech genów mitochondrialnych wyodrębniono 15 haplotypów *E. multilocularis* izolowanych od lisów w Polsce. Czternaście z nich zostało zgrupowanych w kładzie europejskiej (w tym jeden haplotyp dominujący charakterystyczny dla Polski i Estonii), natomiast jeden haplotyp (stanowiący 10% wszystkich izolatów) został zaklasyfikowany do grupy haplotypów azjatyckich. Jest to jak dotąd najdalej wysunięta na zachód Europy lokalizacja haplotypu azjatyckiego. Badania wskazują na istotny wpływ zarówno haplotypów typowo europejskich jak i azjatyckich w kształtowaniu różnorodności genetycznej tego pasożyta w Europie środkowo-wschodniej.

## Piśmiennictwo

- Al-Sabi M.N.S., Kapel C.M.O., Deplazes P., Mathis A. 2007: Comparative copro-diagnosis of *Echinococcus multilocularis* in experimentally infected foxes. *Parasitology Research* 101: 731-736.
- Antolova D., Reiterova K., Miterpakova M., Dinkel A., Dubinsky P. 2009: The first finding of *Echinococcus multilocularis* in dogs in Slovakia: An Emerging Risk for Spreading of Infection. *Zoonoses and Public Health* 56: 53-58.
- Borecka A., Gawor J., Malczewska M., Malczewski A. 2007: Prevalence of *Echinococcus multilocularis* tapeworm in red foxes in central Poland. *Medycyna Wet* 63: 1333-1335.
- Borecka A., Gawor J., Malczewska M., Malczewski A. 2008: Occurrence of *Echinococcus multilocularis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in southern Poland. *Helminthologia* 45: 24-27.

- Bruzinskaite R., Sarkunas M., Torgerson P.R., Mathis A., Deplazes P. 2009: Echinococcosis in pigs and intestinal infection with *Echinococcus* spp. in dogs in southwestern Lithuania. *Vet. Parasitol.* 160: 237–241.
- Casulli A., Manfredi M.T., La Rosa G., Di Cerbo A.R., Dinkel A., Romig T., Deplazes P., Genchi C., Pozio E.: *Echinococcus multilocularis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) of the Italian Alpine region: is there a focus of autochthonous transmission? *Int. J. Parasitol.* 2005,35,1079-1083.
- Casulli A., Szell Z., Pozio E., Sreter T.: Spatial distribution and genetic diversity of *Echinococcus multilocularis* in Hungary. *Vet. Parasitol.* 2010,174,241-246.
- Combes B., Comte S., Raton V., Raoul F., Boue F., Umhang G., Favier S., Dunoyer C., Woronoff N., Giraudoux P.: Westward spread of *Echinococcus multilocularis* in foxes, France, 2005–2010. *Emerg Infect Dis* 2012, 18, 2059–2062
- Denzin N., Schliephake A., Froehlich A., Ziller M., Conraths F.J.: On the move? *Echinococcus multilocularis* in red foxes of Saxony–Anhalt (Germany). *Transbound Emerg Dis* 2014, 61, 239–246.
- Dinkel A., von Nickisch–Roseneck M., Bilger B., Merli M., Lucius R., Romig T. 1998: Detection of *Echinococcus multilocularis* in the definitive host: Coprodiagnosis by PCR as an alternative to necropsy. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1871–1876.
- Dyachenko V., Pantchev N., Gawłowska S., Vrhovec M.G., Bauer C. 2008: *Echinococcus multilocularis* infections in domestic dogs and cats from Germany and other European countries. *Vet Parasitol* 157: 244–253.
- Eckert J. 2003: Predictive values and quality control of techniques for the diagnosis of *Echinococcus multilocularis* in definitive hosts. *Acta Tropica* 85: Pii s0001-706x(02)00216-4, 157-163.
- Eckert J., Deplazes P., Craig P.S., Gemmell M.A., Gottstein B., Heath D., Jenkins D.J., Kamiya M., Lightowers M.: *Echinococcosis in animals: clinical aspects, diagnosis and treatment*. In: *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern*, edited by J. Eckert, M.A. Gemmell, F.X. Meslin and Z.S. Pawlowski, World Organisation for Animal Health, Paris, France, 2001, pp. 72-99
- Hofer S., Gloor S., Muller U., Mathis A., Heggin D., Deplazes P. 2000: High prevalence of *Echinococcus multilocularis* in urban red foxes (*Vulpes vulpes*) and voles (*Arvicola terrestris*) in the city of Zurich, Switzerland. *Parasitology* 120: 135–142.
- Kapel C.M.O., Torgerson P.R., Thompson R.C.A., Deplazes P. 2006: Reproductive potential of *Echinococcus multilocularis* in experimentally infected foxes, dogs, raccoon dogs and cats. *Int J Parasitol* 36: 79–86.
- Kimura M., Toukairin A., Tatzaki H., Tanaka S., Harada K., Araiya J., Yamasaki H., Sugiyama H., Morishima Y., Kawanaka M. 2010: *Echinococcus multilocularis* Detected in Slaughtered Pigs in Aomori, the Northernmost Prefecture of Mainland Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 63: 80-81.
- Knapp J., Bart J.-M., Giraudoux P., Glowatzki M.-L., Breyer I., Raoul F., Deplazes P., Duscher G., Martinek K., Dubinsky P., Guislain M.-H., Cliquet F., Romig T., Malczewski A., Gottstein B., Piarroux R. 2009: Genetic diversity of the Cestode *Echinococcus multilocularis* in red foxes at a continental scale in Europe. *Plos Neglect. Trop. Dis.* 3: e452, e452.
- Konyaev S.V., Yanagida T., Nakao M., Ingovatova G.M., Shoykhet Y.N., Bondarev A.Y., Odnokurtsev V.A., Loskutova K.S., Lukmanova G.I., Dokuchaev N.E., Spiridonov S., Alshinecky M.V., Sivkova T.N., Andreyanov O.N., Abramov S.A., Krivopalov A.V., Karpenko S.V., Lopatina N.V., Dupal T.A., Sako Y., Ito A. 2013: Genetic diversity of *Echinococcus* spp. in Russia. *Parasitology* 140: 1637-1647.

- Lass A., Szostakowska B., Myjak P., Korzeniewski K. 2015: The first detection of *Echinococcus multilocularis* DNA in environmental fruit, vegetable, and mushroom samples using nested PCR. *Parasitology Research* 114: 4023-4029.
- Machnicka–Rowińska B., Rocki B., Dziemian E., Kolodziej–Sobocinska M. 2002: Raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) the new host of *Echinococcus multilocularis* in Poland. *Wiad Parazytol* 48: 65–68.
- Malczewski A., Gawor J., Malczewska M. 2008: Infection of red foxes (*Vulpes vulpes*) with *Echinococcus multilocularis* during the years 2001–2004 in Poland. *Parasitol Res* 103: 501-505.
- Malczewski A., Rocki B., Ramisz A., Eckert J. 1995: *Echinococcus multilocularis* (Cestoda), the causative agent of alveolar echinococcosis in humans - first record in Poland. *J Parasitol* 81: 318-321.
- Miterpakova M., Dubinsky P., Reiterova K., Stanko M.: Climate and environmental factors influencing *Echinococcus multilocularis* occurrence in the Slovak Republic. *Ann. Agr. Env. Med.* 2006,13,235-242.
- Nahorski W.L., Knap J.P., Pawlowski Z.S., Krawczyk M., Polanski J., Stefaniak J., Patkowski W., Szostakowska B., Pietkiewicz H., Grzeszczuk A., Felczak–Korzybska I., Golab E., Wnukowska N., Paul M., Kacprzak E., Sokolewicz–Bobrowska E., Niscigorska–Olsen J., Czyrznikowska A., Chomicz L., Cielecka D., Myjak P. 2013: Human alveolar echinococcosis in Poland: 1990–2011. *Plos. Neglect. Trop. D.* 7: e1986, e1986.
- Nakao M., Xiao N., Okamoto M., Yanagida T., Sako Y., Ito A. 2009: Geographic pattern of genetic variation in the fox tapeworm *Echinococcus multilocularis*. *Parasitol. Int.* 58: 384-389.
- OIE: Echinococcosis/hydatidosis (infection with *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis*). In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, edited by Office International des Epizooties, Paris, France, 2008, pp. 1-15
- Oksanen A., Siles-Lucas M., Karamon J., Possenti A., Conraths F.J., Romig T., Wysocki P., Mannocci A., Mipatrini D., La Torre G., Boufana B., Casulli A. 2016: The geographical distribution and prevalence of *Echinococcus multilocularis* in animals in the European Union and adjacent countries: a systematic review and meta-analysis. *Parasites Vectors* 9: 1-23.
- Pacon J., Soltysiak Z., Nicpon J., Janczak M. 2006: Prevalence of internal helminths in red foxes (*Vulpes vulpes*) in selected regions of Lower Silesia. *Medycyna Wet* 62: 67-69.
- Ramisz A., Eckert J., Balicka-Ramisz A., Grupiński T., Pilarczyk B., Krol-Pospieszny A., Slowikowski P. 1997: Prevalence of *Echinococcus multilocularis* in foxes in the Western Poland. *Medycyna Wet* 53: 340-342.
- Rausch R.L., Fay F.H., Williamson F.S.L. 1990: The ecology of *Echinococcus multilocularis* (Cestoda, Taeniidae) on St. Lawrence Island, Alaska .2. Helminth populations in the definitive host. *Annales De Parasitologie Humaine Et Comparee* 65: 131-140.
- Rocki B., Malczewski A., Eckert J. 1999: Studies on the incidence of *Echinococcus multilocularis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in north-east, central and south of Poland. *Wiadomosci parazytologiczne* 45: 391-393.
- Sager H., Moret C.S., Grimm F., Deplazes P., Doherr M.G., Gottstein B. 2006: Coprological study on intestinal helminths in Swiss dogs: temporal aspects of anthelmintic treatment. *Parasitol. Res.* 98: 333–338.
- Staubach C., Hoffmann L., Schmid V.J., Ziller M., Tackmann K., Conraths F.J.: Bayesian space-time analysis of *Echinococcus multilocularis* – infections in foxes. *Vet Parasitol* 2011, 179, 77–83.
- Sydler T., Mathis A., Deplazes P. 1998: *Echinococcus multilocularis* lesions in the livers of pigs kept outdoors in Switzerland. *4 European Journal of Veterinary Pathology.* : 43-46.

- Szostakowska B., Lass A., Kostyra K., Pietkiewicz H., Myjak P. 2014: First finding of *Echinococcus multilocularis* DNA in soil: Preliminary survey in Varmia–Masuria Province, northeast Poland. *Vet. Parasitol.* 203: 73–79.
- Takumi K., de Vries A., Chu M.L., Mulder J., Teunis P., van der Giessen J.: Evidence for an increasing presence of *Echinococcus multilocularis* in foxes in the Netherlands. *Int J Parasitol* 2008, 38, 571–578
- Umhang G., Comte S., Raton V., Hormaz V., Boucher J.M., Favier S., Combes B., Boue F. 2014: *Echinococcus multilocularis* infections in dogs from urban and peri–urban areas in France. *Parasitol Res* 113: 2219–2222.
- Umhang G., Raton V., Comte S., Hormaz V., Boucher J.-M., Combes B., Boue F. 2012: *Echinococcus multilocularis* in dogs from two French endemic areas: No evidence of infection but hazardous deworming practices. *Veterinary Parasitology* 188: 301-305.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych)

Od początku pracy biorę aktywny udział w działalności naukowej Zakładu Parazytologii i Chorób Inwazyjnych. W ciągu ponad 16 lat pracy uczestniczyłem w realizacji 32 zadań i projektów badawczych. Były to m.in. tematy wynikające z działalności statutowej Instytutu. Uczestniczyłem w realizacji 19 tego typu zadań (w 4 jako kierownik tematu). Ich tematyka obejmowała m.in. zagadnienia echinokokozy, rzęsistkowicy, kokcydiozy, *Taenia solium*, toksoplazmozy, zarazy stadniczej koni, włośnicy, *Cryptosporidium*, *Giardia*, parazytologicznego badania osadów ściekowych, a także inwazji *Dermanyssus galinae*.

Ponadto, uczestniczyłem w realizacji 5 zadań programu wieloletniego (w 2 jako kierownik zadania), które obejmowały swoją tematyką inwazję *Echinococcus* u lisów, psów i zwierząt rzeźnych, a także rozprzestrzenienie pierwotniaków *Toxoplasma gondii* oraz *Cryptosporidium* i *Giardia* w populacji świń i bydła.

Brałem również udział w 8 grantach (w 1 jako kierownik tematu). Ich tematyka dotyczyła m.in. występowania *E. multilocularis*, występowania pasożytniczych helmintów u wolnożyjących zwierząt mięsożernych, rozprzestrzeniania toksoplazmozy u zwierząt hodowlanych i dzikich, anisakiozy oraz opracowania metod do parazytologicznego badania nawozów organicznych. Na uwagę zasługuje mój udział w projekcie fundowanym przez Europejskie Biuro ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) realizowanym przez międzynarodowym konsorcjum, dotyczącym inwazji *E. multilocularis* u zwierząt w Europie.

Dokładne dane dotyczące w/w projektów badawczych przedstawiono w **załączniku nr 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego**. W załączniku tym zamieszczono także pełny spis moich osiągnięć w postaci szczegółowych wykazów: publikacji, działalności dydaktycznej, wykonanych recenzji, nagród, udziału w konferencjach naukowych, członkostwa w organizacjach naukowych, staży naukowych, a także mojego udziału w działalności referencyjnej Zakładu Parazytologii i Chorób Inwazyjnych.

Tematykę mojej działalności badawczej (z wyłączeniem prac opisanych w jednotematycznym cyklu publikacji) można podzielić na główne kierunki.

## Kokcydioza prosiąt

W pierwszym okresie pracy naukowej moim głównym tematem badawczym były zagadnienia związane z kokcydiozą prosiąt. Spośród licznych czynników chorobotwórczych wywołujących biegunkę u prosiąt ssących, kokcydzie, a szczególnie gatunek *Isoospora* (*Cystoisospora*) *suis*, odgrywają wiodącą rolę. Objawy kliniczne związane są z niszczącym działaniem form rozwojowych tych pierwotniaków na nabłonek jelita cienkiego, a związane z tym straty ekonomiczne w hodowli trzody chlewnej dotyczą głównie gorszych przyrostów masy ciała. Kokcydzie *I. suis* identyfikowano jako znaczący czynnik chorobotwórczy w wielu krajach Europy, a także na innych kontynentach. Ponieważ w Polsce sytuacja epizootyczna dotycząca kokcydiozy prosiąt była praktycznie nieznana podjąłem badania w tym zakresie. Przeprowadzono badania nad występowaniem kokcydiów na terenie 14 województw. Przebadano 267 miotów prosiąt ssących (oraz tę samą liczbę macior będących ich matkami) w 104 gospodarstwach o różnej wielkości. Oocysty *I. suis* stwierdzono u 28% miotów prosiąt pochodzących z 67% chlewni. Natomiast oocysty kokcydiów z rodzaju *Eimeria* u 3% miotów prosiąt z 12% chlewni. Najwyższy odsetek prosiąt zarażonych *I. suis* wykazano w dużych fermach (powyżej 100 macior). Natomiast w małych, indywidualnych gospodarstwach częściej stwierdzano oocysty *Eimeria*. Nie wykazano korelacji w występowaniu oocyst w kale pomiędzy maciorami i pochodzącymi od nich prosiętami, co wskazuje na zanieczyszczone podłoże kojców jako główne źródło zarażenia. W dalszym etapie badań przeprowadzono doświadczalne zarażenie prosiąt. Oceniono dynamikę wydalania oocyst, która była bardzo zróżnicowana u poszczególnych prosiąt. Mianowicie u prosiąt zarażonych identyczną dawką różnice w liczbie oocyst w 1 g kału sięgały kilkudziesięciu tysięcy – co potwierdza konieczność pobierania do badań diagnostycznych rutynowych kilku próbek z miotu a by uzyskać wiarygodny wynik. Opisano zmiany anatomopatologiczne udokumentowane preparatami histopatologicznymi oraz zdjęciami wykonanymi mikroskopem skaningowym. W porównaniu do grupy kontrolnej (prosięta niezarażone) zaobserwowano istotnie niższe przyrosty masy ciała u prosiąt zarażonych – różnica utrzymywała się długo po ustąpieniu objawów chorobowych (przez cały okres obserwacji tj. do 7 tygodnia życia). Wskazuje to na trwałe upośledzenie wchłaniania substancji odżywczych spowodowane inwazją *I. suis* przebytą w pierwszych tygodniach życia. Kolejnym etapem badań była próba opracowania skutecznej metody rozpoznawania inwazji *I. suis*. Ze względu na specyfikę biegunkowego kału prosiąt rutynowo używane metody koproskopowe często zawodzą, szczególnie w pierwszych etapach inwazji. Na bazie uzyskanych surowic anti-*I. suis* opracowano test immunoenzymatyczny do wykrywania koproantygenów *I. suis*. Wykazano możliwość wykrywania antygenów *I. suis* w kale, jednak relatywnie niska czułość uniemożliwiła wprowadzenie metody na tym etapie do rutynowej diagnostyki. Ponieważ składnikiem kału biegunkowego prosiąt, który znacząco ogranicza skuteczność metod mikroskopowych jest tłuszcz – w dalszych etapach badań opracowano metodę diagnostyczną mającą na celu wyeliminowanie go z próbki. Do tego celu użyto preparatu Percoll, który skutecznie oddzielał frakcję tłuszczową od reszty próbki. Wykonano badania próbek sztucznie wzbogacanych oocystami w różnych wariantach i proporcjach płynu flotującego. Podczas badania okazało się, że „odzysk” oocyst z jest nawet kilkudziesięciokrotnie wyższy niż w zastosowanej równolegle metodzie McMastera bez użycia Percoll-u. Ponadto

zastosowanie optymalnego wariantu opracowanej metody do badania kału pobieranego od prosiąt eksperymentalnie zarażonych dało znacząco lepsze rezultaty (oocysty stwierdzono w dwukrotnie większej liczbie próbek niż tradycyjną metodą McMastera). Opracowana metoda została wprowadzona jako procedura badawcza do rutynowego badania kału prosiąt ssących. Badania dotyczące kokcydiozy prosiąt były wykonywane w większości w ramach mojej pracy doktorskiej, której promotorem była Pani prof. dr hab. Irena Ziomko. Poniżej wybrane publikacje dotyczące tego zagadnienia.

- Ziomko I. **Karamon J.**: Kokcydiozy świń. *Medycyna Wet.* 58, 921-924, 2002
- **Karamon J.**, Ziomko I., Cencek T.: Prevalence of *Isospora suis* and *Eimeria* spp. In suckling piglets and sows In Poland. *Veterinary Parasitology* 147, 171-175, 2007.
- **Karamon J.**, Ziomko I.: Występowanie kokcydiów u prosiąt ssących i macior w Polsce. *Medycyna Wet.* 62, 2006, 294-296
- **Karamon J.**, Ziomko I., Cencek T.: Inwazja *Isospora suis* u prosiąt. *Medycyna Wet.* 63 (12) 1546-1550, 2007.
- **Karamon J.**, Ziomko I., Cencek T., Sroka J.: Modified flotation method with the use of Percoll for the detection of *Isospora suis* oocysts in suckling piglet faeces. *Vet. Parasitol.* 2008, 3-4, 324-328.
- **Karamon J.**, Ziomko I., Cencek T.: Detection of *Isospora suis* coproantigens using indirect sandwich ELISA – a preliminary study. *Bull Vet Inst Pulawy* 51, 541-545, 2007
- **Karamon J.**, Ziomko I., Cencek T., Sroka J., Kozaczyński W., Karpińska T.: Course of experimental *Isospora suis* infection in piglets. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 2008, 4, 537-540.

### **Kokcydioza kurcząt**

Moje zainteresowania w pierwszych latach pracy naukowej obejmowały także zagadnienie kokcydiozy kurcząt. Brałem udział w kilku doświadczeniach obejmujących eksperymentalne zarażeniach kurcząt w ramach badań rejestracyjnych dotyczących szczepionek oraz preparatów do zwalczania inwazji *Eimeria* u drobiu. Jedną z bardziej złożonych prac w tym zakresie, w której aktywnie uczestniczyłem, były badania nad skutecznością podjednostkowej szczepionki CoxAbic<sup>®</sup> w zapobieganiu kokcydiozie kurcząt. Szczepionka ta prezentuje nowe podejście do swoistej profilaktyki tej inwazji. Bazuje ona na biernym przekazywaniu przeciwciał wytworzonych przez szczepione nioski, poprzez żółtko, na kurczęta, zabezpieczając je w pierwszym okresie życia. Szczepionkę stanowi antygen *Eimeria maxima*, którym kury immunizowane są domięśniowo. Badania prowadzone na 4 grupach kurcząt (grupa szczepiona, grupy kontrolne w tym jedna otrzymująca diklazuril). W każdej grupie umieszczany był jeden siewca zarażony niską dawką oocyst. W 34 dniu życia przeprowadzono zarażenie wysoka dawką oocyst. W trakcie doświadczenia określano liczbę wydalanych oocyst oraz oceniano zmiany sekcyjne w poszczególnych grupach. Wykazano znacząco (korzystniejszy) indeks zmian patologicznych a także przyrosty masy ciała w grupie kurcząt pochodzących od szczepionych niosek w stosunku do pozostałych grup. Badania prowadzone były we współpracy z Instytutem Zootechniki w Krakowie dlatego też ocenie podczas doświadczenia podlegały także parametry dotyczące jakości mięsa w poszczególnych grupach kurcząt. Poniżej wybrane publikacje dotyczące tego tematu:

- Ziomko I., **Karamon J.**, Cencek T., Gornowicz E., Skoracki A., Ashash U.: Prevention of broiler chick coccidiosis using the inactivated subunit vaccine CoxAbic. Bull. Vet. Inst. Pulawy, 2005, 49, 299-302.
- Gornowicz E., Ziomko I., **Karamon J.**, Baszczyński J.. The comparative meat quality in broiler chickens subjected to various methods of coccidiosis prophylaxis, Animal Science, 2006, vol.1, Supl., 152-153
- Gornowicz E., Ziomko I., **Karamon J.**, Skoracki A.: Selected performance traits In broiler fed on diet with or without addend Diclazuril preparation and with those In broiler chickens from parent stock hens vaccinated with Eimeria subunits. Arch. Geflugelk, 71 (2), 62-67, 2007

### **Zaraza stadnicza koni (*Trypanosoma equiperdum*)**

Od początku mojej pracy naukowej biorę czynny udział w aktywnościach dotyczących zarazy stadniczej koni (inwazji świdrowca końskiego *Trypanosoma equiperdum*). Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych, ze względu na pełnioną funkcję laboratorium referencyjnego w tym zakresie, jest utrzymywany w ciągłej gotowości do badań odwoławczych oraz pełni funkcję koordynującą, nadzorującą i doradczą dla laboratoriów w Zakładach Higieny Weterynaryjnej w całej Polsce (organizacja badań biegłości, szkolenia, instrukcje, wizyty kontrolne). W działalności tej biorę czynny udział od 2003 roku. Ponadto uczestniczyłem w projekcie realizowanym przez Zakład mającym na celu wytworzenie własnego antygeny *T. equiperdum* oraz surowicy kontrolnej anti-*T. equiperdum* do zastosowania w odczynie wiązania dopełniacza (OWD). Brałem udział w badaniach dotyczących nowatorskiego zastosowania czytnika ELISA do odczytu wyników OWD oraz analizy wybranych właściwości komercyjnych antygenów *T. equiperdum*. Poniżej publikacje dotyczące tego tematu:

- Cencek T., **Karamon J.**, Ziomko I.: Wybrane właściwości komercyjnych antygenów *Trypanosoma equiperdum*. Medycyna Wet., 2005, 61, 691-693
- Cencek T., **Karamon J.**, Ziomko I., Sroka J.: Application of ELISA reader in complement fixation test used for dourine diagnosis. A preliminary study. Bull. Vet. Inst. Pulawy, 2008, 3, 363-368

### **Pasożyty jelitowe zwierząt mięsożernych**

W ostatnich latach równolegle do badań w kierunku tasiemców *Echinococcus multilocularis* u lisów, prowadzę także badania dotyczące innych pasożytów jelitowych zwierząt mięsożernych, ze szczególnym uwzględnieniem pasożytów zagrażających zdrowiu i życiu człowieka. W ramach kierowanego przeze mnie grantu przeprowadzono badania parazytologiczne u szopów praczy na terenie woj. lubuskiego. Jest to stosunkowo nowy gatunek na terenie Polski, który niesie za sobą także poważne zagrożenie zoonotyczne w postaci glisty *Baylisascaris procyonis*. Przebadano jelita 55 szopów oraz próbki kału pobierane co miesiąc przez 1 rok z charakterystycznych miejsc defekacji tych zwierząt (tzw. latryn). Najczęściej stwierdzano *Mesocestoides* spp. (67%) - tasiemce (popularne u rodzimych

gatunków zwierząt mięsożernych), które prawdopodobnie niedawno skolonizowały stosunkowo nowy w tym rejonie gatunek żywiciela. Wskazuje na to także kilkakrotnie wyższy odsetek zarażonych szopów w porównaniu do wyników uzyskanych w kraju pochodzenia. Ponadto stwierdzano także nicienie z rodzaju *Capillaria* oraz przywry z rodziny Echinostomatidae. Natomiast w 3 próbkach kału stwierdzono jaja *B. procyonis*, co potwierdziło obecność tego groźnego dla człowieka nicienia na terenie Polski. Stosunkowo niski poziom inwazji nie powinien być jednak lekceważony - wraz ze wzrostem zagęszczenia populacji szopów w naszym kraju można się spodziewać wzrostu ekstensywności tego pasożyta.

Inne badania przeprowadzone w latach 2014-2015 we współpracy z Instytutem Parazytologii Państwowej Akademii Nauk dotyczyły występowania pasożytów jelitowych u jenotów i lisów na terenie Puszczy Augustowskiej. Badanie jelit jenotów i lisów wykazało bardzo wysoką ekstensywność (blisko 100%) inwazji pasożytniczych helmintów u tych zwierząt. Ponadto stwierdzono obecność groźnych dla człowieka nicieni i tasiemców (*Toxocara* spp. i *E. multilocularis*). Zaobserwowano ciekawe z parazytologicznego punktu widzenia różnice w występowaniu poszczególnych pasożytów (lub częstości ich występowania) u obu gatunków zwierząt (np. nicienie *Molineus* spp. i przywry z rodziny Echinostomatidae stwierdzano tylko u jenotów) co związane jest prawdopodobnie z odmiennym trybem życia i preferencjami żywieniowymi. Poniżej publikacje dotyczące tego tematu.

- **Karamon J**, Kochanowski M, Cencek T, Bartoszewicz M, Kusyk P . Gastrointestinal helminths of raccoons (*Procyon lotor*) in western Poland (Lubuskie province) - with particular regard to *Baylisascaris procyonis* Bull Vet Inst Pulawy, 2014, 58, 547-552
- **Karamon J**, Samorek-Pierog M, Moskwa B, Różycki M, Bilaska-Zajac E, Zdybel J, Włodarczyk M: Intestinal helminths of raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) and red foxes (*Vulpes vulpes*) from the Augustow Primeval Forest (north-eastern Poland). Journal of Veterinary Research , 2016, 60, 273-277

### **Identyfikacja *Taenia solium***

*Taenia solium* jest uznawany za jeden z najgroźniejszych pasożytniczych czynników zoonotycznych. Ze względu na bardzo niebezpieczne następstwa inwazji tego pasożyta u ludzi, szczególnie jego form larwalnych (wągryca), konieczne wydaje się prowadzenie skutecznej kontroli jego występowania i identyfikacji źródeł zarażenia. Urzędowe wizualne badanie poubojowe świń w wielu przypadkach może być niewystarczające. W latach 2011-2012 prowadziłem badania dotyczące udoskonalenia metod molekularnej identyfikacji form rozwojowych tasiemców z gatunku *Taenia solium*. W ramach badań zoptymalizowano i porównano skuteczność trzech metod PCR. Wykazano, że spośród nich najbardziej czuła i specyficzna jest metoda nested PCR oparta na amplifikacji genu kodującego specyficzne białko onkosfer Tso3. Pozostałe metody ze względu na niesatysfakcjonujące parametry zostały uznane za metody o ograniczonej użyteczności w zakresie identyfikacji *T. solium*, głównie ze względu na reakcje niespecyficzne. Poniżej publikacja dotyczących tych badań.



- **Karamon J**, Sroka J, Cencek T, Różycki M, Chmurzyńska E, Bilska-Zajac, E, Zdybel J, Nowak P, Kędzierska J, Dębiak P: Optimisation and comparison of three PCR procedures for molecular identification of *Taenia solium*. Bulletin- Veterinary Institute in Pulawy, 2013, 57, 507-512

### Ocena skuteczności metod parazytologicznych

Ogromna większość metod koproskopowych funkcjonująca w diagnostyce parazytologicznej nie jest prawidłowo zwalidowana, a ocena ich skuteczności opiera się głównie na teoretycznych założeniach zakładających 100%-owy odzysk form pasożytniczych. Praktyka (w tym także własne doświadczenia w walidacji metod dotyczących wykrywania *E. multilocularis*) pokazała, że założenia te wymagają weryfikacji. W Zakładzie Parazytologii i Chorób Inwazyjnych podjęto bardzo pracochłonne badania związane z oceną skuteczności wybranych metod koproskopowych, które bezpośrednio nadzorowałem i w których brałem czynny udział. Oceniono skuteczność rutynowej metody McMastera oraz stosunkowo nowej metody FLOTAC. Badania prowadzono z użyciem próbek o znanej zawartości jaj pasożytów (z rodzaju *Toxocara*, *Trichuris* i *Ascaris*), co pozwoliło na określenie realnych parametrów metod. Badania wykazały, że teoretyczne założenia dotyczące wydajności metod odbiegają od rzeczywistości, a parametry są różne dla poszczególnych rodzajów jaj pasożytów. Mianowicie, skuteczność metody McMastera w wykrywaniu jaj *Ascaris* była nieco tylko niższa od zakładanej, natomiast odzysk jaj *Trichuris* i *Toxocara* był odpowiednio 2 lub 3 krotnie niższy, co wymagało zastosowania innych współczynników przy ocenie ilościowej. Podobnie dla metody FLOTAC (opisywanej przez twórców jako metoda o 100% odzysku) przy badaniu próbek domieszkowanych odzysk ten wynosił od 20 do 40% w zależności od gatunku pasożyta. Przeprowadzone badania dotyczące walidacji mikroskopowych metod parazytologicznych są pionierskie w skali światowej. Poniżej publikacje związane z tym tematem.

- Kochanowski M, Dąbrowska J, **Karamon J**, Cencek T, Osiński Z: Analysis of the accuracy and precision of the McMaster method in detection of the eggs of *Toxocara* and *Trichuris* species (Nematoda) in dog faeces, 2013, 60, 264-272
- Kochanowski M, **Karamon J**, Dąbrowska J, Cencek T. Experimental estimation of the efficacy of the FLOTAC basic technique. *Journal of Parasitology* 2014,100, 633-
- Kochanowski M, **Karamon J**, Dąbrowska J, Cencek T: Koproskopowe metody ilościowe w weterynaryjnej diagnostyce parazytologicznej zastosowanie i problemy w szacowaniu ich skuteczności *Postępy Mikrobiologii (Advances in Microbiology)*, 2013, 52, 111-118

### *Echinococcus* spp.

Tematyka dotycząca echinokokozy jest głównym kierunkiem moim badań od kilku lat. Zainteresowałem się tym tematem głównie ze względu na duże zagrożenie jakie stanowi inwazja pasożytów z rodzaju *Echinococcus* dla zdrowia ludzi. Swoje zainteresowania badawcze skupiłem szczególnie na gatunku *E. multilocularis*, który jest najgroźniejszym czynnikiem zoonotycznym w naszej strefie klimatycznej. Istniejące luki w wiedzy dotyczące

epidemiologii tych tasiemców, a także braki w ocenie skuteczności metod diagnostycznych oraz zróżnicowania genetycznego skłoniły mnie do badań, które zaowocowały licznymi publikacjami. Większość z nich, włączona została do jednotematycznego cyklu publikacji i omówiona w pierwszej części autoreferatu.

W trakcie prac w zakresie echinokokozy zostałem zaproszony do współpracy w realizacji europejskiego projektu fundowanego przez Europejskie Biuro ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) w ramach międzynarodowego konsorcjum. Celem 3 letniego projektu było opracowanie raportu dotyczącego inwazji *E. multilocularis* u zwierząt w Europie, który będzie podstawą do tworzenia regulacji prawnych związanych z tą zoonozą. W ramach prac grupy roboczej wykonywałem **systematyczny przegląd literatury (systematic review) oraz meta-analizę** zebranych danych dotyczących *E. multilocularis* (obejmowała ona ocenę ponad 400 pełnych tekstów artykułów i szczegółową analizę danych z ponad 250 artykułów). Owocem tych prac był raport, a także wieloautorska publikacja przeglądowa stanowiąca wiarygodne i szczegółowe kompendium wiedzy dotyczącej inwazji *E. multilocularis* u zwierząt w Europie (której jestem jednym z trzech pierwszych autorów). Ponadto jestem współautorem publikacji przeglądowej dotyczącej epidemiologii i rozpoznawania inwazji *E. granulosus*.

- Oksanen A\*, Siles-Lucas M\*, **Karamon J\***, Possenti A., Conraths F.J., Romig T., Wysocki P., Mannocci A., Mipatrini D., La Torre G., Boufana B., Casulli A. 2016: The geographical distribution and prevalence of *Echinococcus multilocularis* in animals in the European Union and adjacent countries: a systematic review and meta-analysis. *Parasites&Vectors* 9: 1-23. [\*- equal contributors]
- Samorek-Pieróg M, **Karamon J**, Cencek T: *Echinococcus granulosus* - a global zoonotic problem and diagnostic possibilities in animals *Medycyna Weterynaryjna* 2016, 72, 728-734

### **Inna tematyka badawcza**

Brałem aktywny udział w badaniach dotyczących inwazji przywry *Fascioloides magna*, w ramach których opisano i zidentyfikowano pierwszy przypadek tej inwazji w Polsce u daniela hodowlanego. Następnie we współpracy z Instytutem Parazytologii Słowackiej Akademii Nauk oceniono genetyczną strukturę wykrytych pasożytów określając hipotetyczne drogi migracji pasożyta w rejonie centralnej Europy. Uczestniczyłem w prowadzonych w Zakładzie badaniach związanych z inwazją *Toxoplasma gondii*. Badania dotyczyły głównie oceny jakości, a także opracowania nowych metod do serologicznej diagnostyki tej inwazji. W ramach tej tematyki porównano skuteczność metod aglutynacji bezpośredniej, lateksowej i ELISA a także opracowano uniwersalną metodę cELISA do badania surowic świń i bydła. Brałem udział w pracach dotyczących pierwotniaków *Cryptosporidium* i *Giardia*. Zakres prac obejmował ocenę występowania oocyst/cyst tych pasożytów w ściekach. Badano także potencjalną rolę bobrów w zanieczyszczeniu wód formami dyspersyjnymi tych pierwotniaków na pojezierzu Warmińsko-Mazurskim, a także porównano przydatność metod izolacji cyst *Giardia* do badań PCR. Uczestniczyłem w pracach związanych z opracowaniem skutecznych metod **wykrywania żywych jaj nicieni jelitowych w nawozach organicznych i osadach ściekowych**. Opracowano i opisano nowatorskie metody oparte na obserwacji

rozwoju inkubowanych jaj, a także selektywnym barwieniu żywych i martwych jaj nicieni. Brałem udział w pracach nad opracowaniem metod do serologicznej diagnostyki **gzwawicy bydła (*Hypoderma bovis*)** oraz analizy struktury enzymów larw tego pasożyta. Uczestniczyłem w badaniach dotyczących inwazji **ptaszyńca (*Dermanyssus galline*)** na fermach kur. Prace dotyczyły oporności tych roztoczy na różne rodzaje akarycydów w różnych rejonach Polski, a także opracowania laboratoryjnej metody do oceny *in vitro* skuteczności tych środków. Uczestniczyłem w badaniach i opisanie ciekawego przypadku ***Dirofilaria repens*** u psa – była to jedna z pierwszych prac w tym zakresie w Polsce. Ponadto brałem udział w prowadzonych w Zakładzie pracach dotyczących **włośnicy (inwazja *Trichinella* spp.)** oraz **anisakiozy (inwazja *Anisakis simplex*)**. W ramach tych prac opisano pierwszy przypadek inwazji *Trichinella nativa* u lisów i dzików oraz *T. pseudospiralis* u dzików w Polsce. Poniżej lista wybranych publikacji związanych z opisaną w tym akapicie tematyką badawczą.

- **Karamon J**, Larska M, Jasik A, Sell B. First report of the giant liver fluke (*Fascioloides magna*) infection in farmed fallow deer (*Dama dama*) in Poland – pathomorphological changes and molecular identification *Bull Vet Inst Pulawy* 2015, 59, 339-344
- Juhasova L, Bazsalovicsova E, Kralova-Hromadova I, **Karamon J**: A genetic structure of novel population of *Fascioloides magna* from Poland, Podkarpackie Province, indicates an expanding second European natural focus of fascioloidosis. *Acta Parasitologica* 2016, 61, 790-795
- Sroka J., Cencek T., Ziomko I., **Karamon J.**, Zwoliński J.: Preliminary assessment of ELISA, MAT and LAT for detecting *Toxoplasma gondii* antibodies in pigs. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 2008, 4, 545-549.
- Sroka J., Cencek T., **Karamon J.**: Procesy immunologiczne w przebiegu infekcji *Toxoplasma gondii*. *Wiad. Parazytol.* 2009, 55, 141-146.
- Sroka J., **Karamon J.**, Cencek T., Dutkiewicz J.: Preliminary assessment of usefulness of cELISA test for screening pig and cattle populations for presence of antibodies against *Toxoplasma gondii*. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2011, 18, 335-339
- Sroka J , Wójcik-Fatla A, Zajac V, Sawczyn A, Cisak E., **Karamon J**, Dutkiewicz J, Bojar I: Comparison of the efficiency of two commercial kits – ELFA and Western blot in estimating the phase of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 2016, 23, 621–626
- Sroka J., Stojcki K., Zdybel J., **Karamon J.**, Cencek T., Dutkiewicz : Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in effluent from sewage treatment plant from eastern Poland. *Ann. Agric. Environ. Med*, 2013, Spec Issue 1, 57-62
- Stojcki K, Sroka J, **Karamon J**, Kusyk P, Cencek T . Influence of selected stool concentration techniques on the effectiveness of PCR examination in *Giardia intestinalis* diagnostics *Polish Journal of Veterinary Sciences* 2014, 17, 19-25.
- Sroka J., Giżejewski Z., Wójcik-Fatla A., Stojcki K., Bilska-Zajac E., Dutkiewicz J. Cencek T, **Karamon J**, Zajac V. Kusyk P., Dąbrowska J., Kochanowski M.: Potential role of beavers (*Castor fiber*) in contamination of water in the Masurian Lake District (north-eastern Poland) with protozoan parasites *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. *Bull Vet Inst Pulawy* 2015, 59, 219-228.
- Dąbrowska J, Zdybel J, **Karamon J**, Kochanowski M, Stojcki K, Cencek T, Kłapeć T. Assessment of viability of the nematode eggs (*Ascaris*, *Toxocara*, *Trichuris*) in sewage

- sludge with the use of LIVE/DEAD Bacterial Viability Kit. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2014, 21, 204–210
- Zdybel J, Cencek T, **Karamon J**, Kłapeć T: Effectiveness of selected stages of wastewater treatment in elimination of eggs of intestinal parasites *Bull Vet Inst Pulawy* 59, 51-57, 2015,
  - Zdybel J, **Karamon J**, Rozycki M, Bilska-zajac E, Kłapeć T, Cencek T: Characterisation of a new, highly effective method for detecting nematode eggs (*Ascaris* spp., *Toxocara* spp., *Trichuris* spp.) in sewage sludge containing flocculants. *Experimental Parasitology* , 2016, 170, 198-206
  - Cencek T., Ziomko I., **Karamon J.**: Usefulness of ELISA components preserved under different conditions for the detection of *Hypoderma bovis* antibodies. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2001, 45, 197-204
  - Cencek T., **Karamon J.**, Sroka J., Zdybel J.: Rola hypodermin w przystosowaniu larw gźów bydleczych do pasożytniczego trybu życia. *Medycyna Wet.* 2009, 65, 593-596
  - Cencek T., **Karamon J.**, Sroka J., Zdybel J.: Modified method of *Hypoderma bovis* proteins transfer from gel obtained by native electrophoresis onto nitrocellulose membrane. *Bull Vet Inst Pulawy*, 2012, 56, 547-552
  - Zdybel J., **Karamon J.**, Cencek T.: In vitro effectiveness of selected acaricides against red poultry mites (*Dermanyssus gallinae*, De Geer, 1778) isolated from laying hen battery cage farms localised in different regions of Poland. *Bull Vet Inst Pulawy* 55, 411-416, 2011
  - Cencek T., **Karamon J.**, Sroka J., Zdybel J.: New in vitro method for determination of acaricide efficiency against *Dermanyssus gallinae* mites. *Bull Vet Inst Pulawy*, 55, 2011, 657-662
  - Demiaszkiewicz A, **Karamon J**, Jasik, A: Przypadek wykrycia nicienia *Dirofilaria repens* w jądrze psa. *Medycyna Weter.* 2013, 69, 124-127
  - Chmurzyńska E, Różycki M, Bilska-Zajac E, Nöckler K, Mayer-Scholl A, Pozio E, CencekT, **Karamon J**: *Trichinella nativa* in red foxes (*Vulpes vulpes*) of Germany and Poland: possible different origins. *Veterinary Parasitol.* 198, 254-257
  - Bilska-Zajac E, Lalle M, Rozycki M, Chmurzyńska E, Kochanowski M, **Karamon J**, Sroka J, Pozio E., Cencek T: High prevalence of Anisakidae larvae in marketed frozen fillets of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). *Food Control* , 2016, 68, 216-219
  - Bilska-Zajac E, Rozycki M, Chmurzynska E , **Karamon J.**, Sroka J, Antolak,E, Próchniak M, Cencek T: First record of wild boar infected with *Trichinella pseudospiralis* in Poland. *Journal Of Veterinary Research.* 2016, 60, 147-152
  - Chmurzynska E, Rozycki M, Bilska-Zajac E, **Karamon J**, Cencek T: Results of proficiency testing (PT) for *Trichinella* in 2014. *Medycyna Weterynaryjna*, 2016, 72, 312-316
  - Bilska-Zajac E, Rozycki M, Chmurzynska E, Antolak,E, Próchniak M, Grądziel-Krukowska K, **Karamon J**, Sroka J, Zdybel J, Cencek T: First case of *Trichinella nativa* infection in wild boar in Central Europe — molecular characterization of the parasite *Parasitology Research.* 2017, 116, 1705-1711
  - Włodarczyk M, Zdybel J, Próchniak M, Osiński Z, **Karamon J**, Kłapeć T, Cencek T. Viability assessment of *Ascaris suum* eggs stained with fluorescent dyes using digital colorimetric analysis *Experimental Parasitology* 2017, 178, 7-13

**6. Podsumowanie dorobku naukowego** (Szczegółowy wykaz prac naukowych oraz informacji o osiągnięciach dydaktycznych, wykonanych recenzjach, współpracy naukowej i popularyzacji nauki znajduje się w załączniku nr 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego)

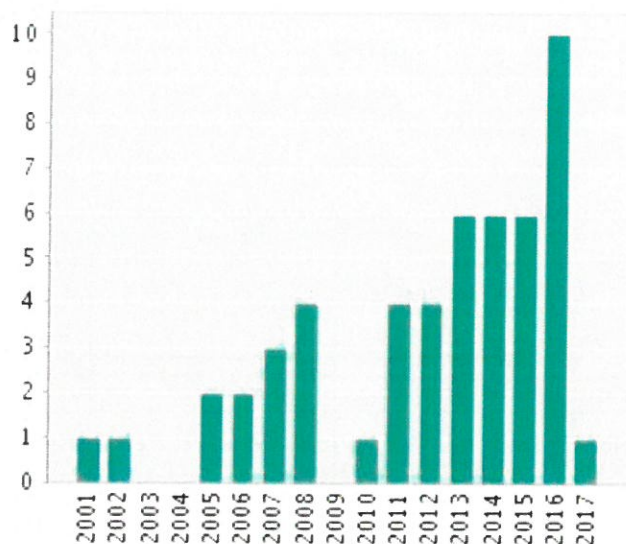
**Zestawienie publikacji naukowych:**

|  |              |
|--|--------------|
| Liczba publikacji w czasopismach z listy JCR                                   | <b>58</b>    |
| - w tym: opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora                           | <b>53</b>    |
| - w tym: stanowiących osiągnięcie habilitacyjne                                | <b>8</b>     |
| Liczba publikacji w czasopismach spoza listy JCR oraz autorstwa w monografiach | <b>58</b>    |
| Liczba komunikatów konferencyjnych   | <b>78</b>    |
| Sumaryczny współczynnik wpływu (Impact Factor, IF)                             | <b>51,21</b> |
| - w tym dla publikacji po uzyskaniu stopnia doktora                            | <b>50,07</b> |
| - w tym dla publikacji stanowiących osiągnięcie habilitacyjne                  | <b>10,34</b> |
| Suma punktów MNiSW   | <b>1256</b>  |
| - w tym: dla publikacji po uzyskaniu stopnia doktora                           | <b>1167</b>  |
| - w tym: dla publikacji stanowiących osiągnięcie habilitacyjne                 | <b>192</b>   |
| Liczba cytowań wg. Web of Science Core Collection                              | <b>139</b>   |
| - w tym: bez autocytowań   | <b>87</b>    |
| Indeks Hirscha wg. Web of Science Core Collection                              | <b>7</b>     |

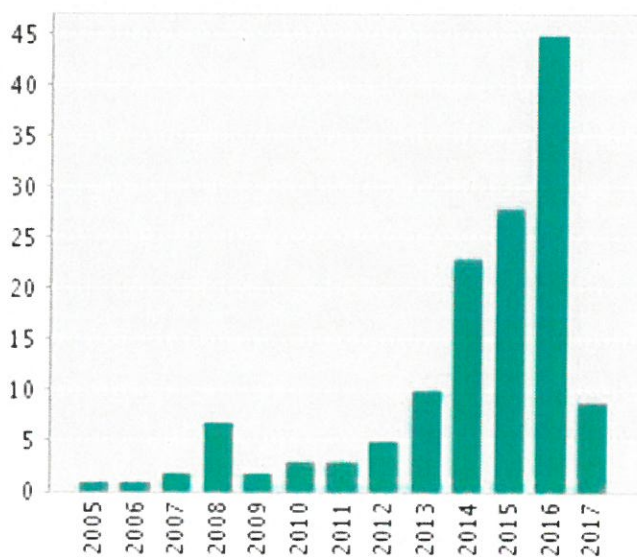
**Zestawienie liczby publikacji w poszczególnych czasopismach z listy JCR**

| <b>Czasopismo</b>  | <b>Liczba publikacji<br/>(w tym jako pierwszy autor)</b> |
|--|--|
| Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy /Journal of Veterinary Research | <b>19 (9)</b>  |
| Medycyna Weterynaryjna   | <b>11(4)</b>   |
| Annals of Agricultural and Environmental Medicine                              | <b>5</b>   |
| Veterinary Parasitology  | <b>4 (3)</b>   |
| Experimental Parasitology  | <b>3 (1)</b>   |
| Folia Parasitologica   | <b>3 (2)</b>   |
| Polish Journal of Veterinary Sciences  | <b>3</b>   |
| Acta Parasitologica  | <b>2</b>   |
| Parasitology Research  | <b>2 (1)</b>   |
| Parasites and Vectors  | <b>1 (1)</b>   |
| Journal of Parasitology  | <b>1</b>   |
| Postępy Mikrobiologii (Advances in Microbiology)                               | <b>1</b>   |
| Archiv fur Geflugelkunde   | <b>1</b>   |
| Animal Science   | <b>1</b>   |
| Food Control   | <b>1</b>   |
| <b>Liczba publikacji razem (w tym jako pierwszy autor)</b>                     | <b>58 (21)</b>   |

**Liczba publikacji w poszczególnych latach**  
(wg. Web of Science - Core Collection, z dnia 2017.05.29)



**Liczba cytacji w poszczególnych latach**  
(wg. Web of Science - Core Collection, z dnia 2017.05.29)



Puławy, 2017.06.01

*Jacek Karanay*