

Załącznik nr 2 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

Autoreferat

dr n. wet Jacek Żmudzki

Państwowy Instytut Weterynaryjny
– Państwowy Instytut Badawczy w Puławach
Zakład Chorób Świń

Puławy, 2018

1. Imię i nazwisko.

Jacek Żmudzki

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

1999 – **lekarz weterynarii** – Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Akademia Rolniczo – Techniczna w Olsztynie

2005 – **doktor nauk weterynaryjnych** – Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach, tytuł rozprawy doktorskiej: „Diagnostyka różnicowa enteropatii krwotocznych świń przy użyciu reakcji polimeryzacji łańcuchowej (PCR)”

2008 – **Specjalista w zakresie Chorób Trzody Chlewnej**, dyplom nadany przez Komisję ds. Specjalizacji Lekarzy Weterynarii, nr dyplomu 2/307/2008, Weterynaryjne Centrum Kształcenia Podyplomowego, Puławy

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

1999 – **lekarz weterynarii** – Zakład Chorób Świń, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

2002 – **asystent** – Zakład Chorób Świń, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

2006 – **adiunkt** – Zakład Chorób Świń, 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. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,

Zwierzęta wolno żyjące (łowne) jako rezerwuar *Leptospira* spp.

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, impact factor IF i punktacja MNiSW aktualna w roku publikacji)

H-1: Żmudzki J. Zwierzęta wolno żyjące jako źródło patogenów zoonotycznych. *Medycyna Weter.* 2017;73:144–51. doi: 10.21521/mw.5656.

IF_{2016/2017} = 0.161; punkty MNiSW = 15; liczba cytowań (WoS Core Collection) – 0

Mój wkład w autorstwo: 100% - pomysł pracy, zebranie piśmiennictwa, napisanie manuskryptu.

H-2: Żmudzki J, Jabłoński A, Nowak A. Behawioryzm dzików w aspekcie szerzenia się czynników zakaźnych. *Lecznica Dużych Zwierząt.* 2016;1:29–35.

IF_{2016/2017} = brak; punkty MNiSW = 1; liczba cytowań (WoS Core Collection) – 0

Mój wkład w autorstwo: 80% - pomysł pracy, zebranie piśmiennictwa, napisanie manuskryptu.

H-3: Żmudzki J, Jabłoński A, Nowak A, Zębek S, Arent Z, Bocian Ł, Pejsak Z. First overall report of *Leptospira* infections in wild boars in Poland. *Acta Vet Scand.* 2016;58:3. doi: 10.1186/s13028-016-0186-7.

IF_{2016/2017} = 1.472; punkty MNiSW = 30; liczba cytowań (WoS Core Collection) – 7

Mój wkład w autorstwo 80% - koncepcja badań, zgromadzenie materiału doświadczalnego, (udział w polowaniach), wykonanie badań laboratoryjnych, interpretacja wyników i napisanie manuskryptu.

H-4: Żmudzki J, Jabłoński J, Arent Z, Zębek S, Nowak A, Stolarek A, Parzeniecka-Jaworska M. First report of *Leptospira* infections in red deer, roe deer and fallow deer in Poland. *J Vet Res.* 2016;60:257–60. doi:10.1515/jvetres-2016-0039.

IF_{2016/2017} = 0.468; punkty MNiSW = 15; liczba cytowań (WoS Core Collection) – 1

Mój wkład w autorstwo 80% - koncepcja badań, zgromadzenie materiału doświadczalnego, (udział w polowaniach), wykonanie badań laboratoryjnych, interpretacja wyników i napisanie manuskryptu.

H-5: Żmudzki J, Arent Z, Jabłoński A, Nowak A, Zębek S, Stolarek A, Bocian Ł, Brzana A, Pejsak Z. Seroprevalence of 12 serovars of pathogenic *Leptospira* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Poland. Acta Vet Scand. 2018;60:34. doi: 10.1186/s13028-018-0388-2.

IF_{2016/2017} = 1.472; punkty MNiSW = 30; liczba cytowań (WoS Core Collection) – 0

Mój wkład w autorstwo 80% - koncepcja badań, zgromadzenie materiału doświadczalnego, wykonanie badań laboratoryjnych, interpretacja wyników i napisanie manuskryptu.

Sumaryczny impact factor publikacji stanowiących dzieło podlegające ocenie wynosi 3,567, a liczba punktów MNiSW wynosi 91, liczba cytowań (WoS Core Collection) – 8

Badania dotyczące osiągnięcia naukowego zostały wykonane w ramach projektu Narodowego Centrum Nauki nr UMO–2013/09/B/NZ7/02563.

c) omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wstęp

Zwierzęta wolno żyjące w tym łowne mogą stanowić i często są rezerwuarem chorobotwórczych drobnoustrojów, zwłaszcza bakterii i wirusów, wywołujących zachorowania u zwierząt i człowieka. Pośrednio udział we wzroście występowania liczby zoonoz człowieka, przy pierwotnym źródle infekcji od zwierząt wolno żyjących, mają również zwierzęta gospodarskie i domowe (**H-1: Żmudzki J. Zwierzęta wolno żyjące jako źródło patogenów zoonotycznych. Medycyna Weter. 2017;73:144–51**). Wśród najbardziej rozpoznawalnych i rozpowszechnionych na świecie chorób odzwierzęcych (zoonoz) jest leptospiroza, której czynnikiem etiologicznym są krętki z rodzaju *Leptospira*. Najczęściej rezerwuarem leptospir są gryzonie i małe ssaki, ale również zwierzęta łowne, świnie, bydło, konie, psy i koty. Do zakażeń leptospirami u zwierząt dochodzi głównie przez kontakt z glebą lub roślinnością zanieczyszczoną moczem zainfekowanych zwierząt (Bharti et al. 2003; Ellis 2012, 2015; Fiecek et al. 2014; Gliński and Kostro, 2013, Janowski et al. 1997; Levett, 2001; Pejsak, 2007; Wasiński et al. 2013).

W ostatnich latach w wielu krajach Europejskich podjęto próby oceny występowania *Leptospira* spp. w populacji zwierząt łownych, zwłaszcza u dzików. W północnej Hiszpanii odsetek zakażonych dzików (n=174) kształtował się na poziomie 5,2% dla serowaru Pomona, 4,7% dla Bratislava, 1,7% dla Grippotyphosa oraz 0,6% dla Icterohaemorrhagiae (Espí et al. 2010). Podobne badania przeprowadzono w Szwecji wśród populacji dzików. Na 386 przebadanych próbek surowic 12 próbek było dodatnich, co stanowiło ogółem 3,1%. Spośród nich 9 (2,3%) było dodatnich dla Bratislava oraz 0,8% dla serowaru Icterohaemorrhagiae (Boqvist et al. 2012). Należy jednak wyraźnie zaznaczyć, że zakażenia *Leptospira* spp. w populacji dzików na terenie Szwecji występują sporadycznie w odróżnieniu do Europy kontynentalnej w której występują znacznie częściej. Z kolei w Niemczech przebadano 141 próbek surowic pochodzących od dzików, z czego 25 (18%) stanowiły próbki dodatnie w kierunku *Leptospira* spp. (Jansen et al. 2007). Również we Włoszech Ebani et al. (2003) zbadali 562 próbki krwi od dzików i stwierdzili, że 6% z nich posiadało przeciwciała dla leptospir. Niemieccy badacze wykazali wysoki odsetek próbek dodatnich dla leptospirozy u dzików żyjących w pobliżu Berlina wynoszący w niektórych dzielnicach (Pankow/Mahrzahn/Hellersdorf) stolicy Niemiec aż 22%. Ten wysoki odsetek zakażonych zwierząt w pobliżu Berlina, może być i często jest źródłem infekcji zarówno u zwierząt domowych jak i człowieka (Jensen et al. 2007). W Polsce badania dotyczące występowania leptospirozy u dzików ograniczone były tylko do obszaru dawnego województwa toruńskiego. Krawczyk (2005) zbadął 98 próbek surowic od dzików i wykazał, że 25% badanych zwierząt miało kontakt z krętkami leptospir, a najczęściej występującymi serowarami były Sejroe (6,1%) i Poi (5,1%).

Leptospiroza jest coraz częściej uznawana jako problem zdrowia publicznego. Zarówno w krajach rozwiniętych jak i rozwijających się obserwuje się wzrost zachorowalności i śmiertelności z jej powodu. W krajach azjatyckich leptospiroza występuje endemicznie, natomiast w Europie zauważalna jest tendencja wzrostowa zachorowań wywoływanych przez *Leptospira* spp.

Obecnie wiadomo, że zarówno u ludzi jak i zwierząt transmisja krętków *Leptospira* spp. do organizmu odbywa się głównie drogą pośrednią poprzez wodę lub żywność zanieczyszczoną moczem zawierającym *Leptospira* spp. Innym sposobem zakażenia u ludzi jest droga bezpośrednia – kontakt z zakażonymi zwierzętami najczęściej podczas wytrzewiania zwierzyny leśnej. Człowiek najczęściej ulega zakażeniu poprzez uszkodzoną skórę, błony śluzowe, spojówki oraz drogi oddechowe. Na infekcję narażeni są szczególnie pracownicy obsługujący zwierzęta, zootechnicy, lekarze weterynarii, pracownicy zakładów mięsnych, ale i

pracownicy zakładów oczyszczania ścieków (choroba zawodowa), górnicy (zakażenia przenoszone przez gryzonie) czy zagrożeni możliwością zakażenia za pośrednictwem środowiska rolnicy, myśliwi. Mniej typowe, a spotykane coraz częściej zakażenia, przenoszone głównie za pośrednictwem wspomnianej wcześniej zanieczyszczonej leptospirami wody odnotowuje się u turystów, zwłaszcza po pobytach w strefach tropikalnych, u sportowców (zajęcia terenowe, pływalnie, rafting, szkoły przetrwania) (Gliński and Kostro 2013; Fiecek et al. 2012; Wasiński et al. 2013). Zakażenia leptospirami pojawiają się również u osób bezdomnych (zakażenia przenoszone przez gryzonie) (Schoonman et al. 2009). Należy zaznaczyć, że w przypadku ciężkiej postaci leptospirozy u ludzi, zwanej chorobą Weila, śmiertelność może sięgać od 5 do 40% (Wasiński et al. 2013).

W Europie leptospiroza najczęściej wykrywana jest we Francji, gdzie występowanie tej choroby podlega wahaniom w zależności od rejonu geograficznego. Rocznie stwierdza się około 600 przypadków zakażeń krętkami *Leptospira* spp. (Assez et al. 2013; Picardeau, 2013; Vijayachari et al. 2008). W Wielkiej Brytanii w latach 2006 – 2010 wykryto 301 przypadków leptospirozy (Forbes et al. 2012), a we Włoszech w latach 1994 – 1996 zdiagnozowano 222 osób, z których 19 zmarło, (Ciceroni et al. 2000) z kolei w latach 1995–2001 zbadano 250 osób, z których 14 (5,60%), okazało się sero – dodatnich (Cerri et al. 2003). Deutz i wsp. (2003) wykazał, że u 10% myśliwych z południowo–wschodniej Austrii stwierdzono przeciwciała dla *Leptospira* spp.

W Polsce Fiecek i wsp. (2012) stwierdzili obecność przeciwciał dla *Leptospira* spp. u 23,6% badanych hodowców trzody chlewnej i lekarzy weterynarii oraz 26,2% pracowników gospodarki komunalnej. Fiecek i wsp. (2017) opisali przypadki leptospirozy (sierpień 2014) u 10 pacjentów pochodzących z różnych regionów Polski, którzy po powrocie z plantacji truskawek w Niemczech prezentowali typowe objawy kliniczne leptospirozy. Wyniki badań przeprowadzonych testem ELISA wykazały obecność przeciwciał dla *Leptospira* spp. u 6 pacjentów (60%), a u dwóch z nich wyniki dodatnie potwierdzono metodą odczynu aglutynacji mikroskopowej (OAM). Pozostałe cztery seronegatywne osoby miały objawy kliniczne podobne do tych prezentowanych przez seropozytywnych pacjentów. Rozpoznanie leptospirozy u tych osób było oparte na danych epidemiologicznych z wywiadu, ujemnych hodowlach krwi i moczu oraz innych negatywnych wynikach testu.

Ze względu na zoonotyczny charakter choroby, leptospirozy w Polsce umieszczone zostały w wykazie chorób zakaźnych i zakażeń człowieka, objętych ustawą z dnia 5 grudnia 2008 r. o zapobieganiu oraz zwalczaniu zakażeń i chorób zakaźnych u ludzi (Dz.U. 2008 nr 234 poz. 1570). Do 2006 r. leptospirozy zwierząt znajdowały się w wykazie chorób zakaźnych

notyfikowanych w Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt – OIE (Wijaszka i Truszczyński, 2008), brak ich natomiast w wykazie chorób zakaźnych zgłoszonych do OIE w 2012 r. (OIE: Animal Health Code. Vol.II. Recommendations applicable to OIE listed diseases and other diseases of importance to international trade).

Cel badań

Jak wskazują dane przedstawione w Europie i w Polsce zachorowania na tle leptospirozy są poważnym problemem epidemiologicznym. Sprzyjają temu migracja zwierząt z okolicznych terenów leśnych do graniczących z nimi aglomeracji miejskich. Również wysypiska śmieci oraz kontenery na śmieci w pobliżu osiedli oraz przebywanie na polach uprawnych zwierząt wolno żyjących stwarza zagrożenie zakażenia człowieka *Leptospira* spp.

W związku ze zwiększającym się niebezpieczeństwem związanym z coraz częstszymi zakażeniami na tle *Leptospira* spp., zasadniczym celem badań była ocena wstępowania zakażeń *Leptospira* spp. w populacji zwierząt wolno żyjących (łownych) na terenie kraju oraz analiza jej możliwego wpływu na zwierzęta gospodarskie oraz człowieka.

Cel badań zrealizowany został poprzez:

- I. Ocenę występowania zoonotycznych krętków *Leptospira* spp. u zwierząt łownych w Polsce jako wskaźnika zagrożenia dla zwierząt gospodarskich, ludzi zamieszkujących aglomeracje miejskie oraz osób mających bezpośredni kontakt z zwierzyną łowną (myśliwi).**
- II. Porównanie wyników przeprowadzonych badań epidemiologicznych u dzików, jeleniowatych oraz lisów do danych krajowych i innych krajów Europejskich.**

Omówienie przeprowadzonych badań i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Ocena zagrożenia ze strony patogennych leptospir dla zwierząt gospodarskich oraz zdrowia i życia człowieka opiera się głównie na badaniach serologicznych polegających na wykrywaniu obecności swoistych przeciwciał dla poszczególnych serowarów leptospir oraz w dalszym etapie umożliwia określenie poziomu miana przeciwciał z wykorzystaniem odczynu aglutynacji mikroskopowej (OAM). Należy zaznaczyć że, OAM jest podstawową i zalecaną metodą w monitoringu zakażeń *Leptospira* spp. Poniższe badania zostały wykonane zgodnie z obowiązującymi standardami europejskimi oraz według zaleceń Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (OIE) (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals

2017; Chapter 2.1.12. Leptospirosis (NB: Version adopted in May 2014); (Wijaszka and Truszczyński, 2008)

Dotychczasowe krajowe badania monitoringowe skupiały się głównie na ocenie sytuacji w zakresie występowania leptospir u zwierząt gospodarskich (Wasiński et al. 2010, 2012; Wasiński, 2005, 2007, 2014; Krawczyk 1999; Arent et al. 2013a,c; Czopowicz et al. 2011). Według najlepszej wiedzy brak jest w kraju badań na szeroką skalę dotyczących prewalencji leptospirozy u zwierząt łownych oraz oceny ewentualnego wpływu tych zakażeń na zwierzęta gospodarskie, towarzyszące i człowieka. Pierwsze przypadki leptospirozy u dzików stwierdzono w 2005 roku, jednak dotyczyły one tylko jednego regionu skupionego wokół miasta Toruń (Krawczyk, 2005). Ponadto zmieniająca się dynamicznie populacja dzików (z wyraźną tendencją wzrostową) skłoniła mnie do podjęcia badań obejmujących obszar całego kraju. W związku z powyższym po raz pierwszy w Polsce przeprowadzono na szeroką skalę badania dotyczące oceny występowania *Leptospira* spp. w populacji dzików. Wyniki tych badań opisałem w publikacji *H-3: Żmudzki et al. First overall report of Leptospira infections in wild boars in Poland. Acta Vet Scand. 2016;58:3*. Dziki z powodu ich behawioryzmu odgrywają szczególną rolę w ekosystemie leśnym, stając się częstym wektorem przenoszącym leptospirozę wśród innych gatunków. Korzystne warunki środowiskowe (łagodne zimy) wynikające ze zmian klimatycznych w Europie doprowadziły do znacznego wzrostu populacji dzika w ostatnim dziesięcioleciu. Przez wiele lat gęstość populacji dzika w Europie i Polsce stale rośnie. W ciągu ostatnich 30 lat doprowadziło to do ponad pięciokrotnego wzrostu liczby dzików w Polsce, począwszy od 46 tys. w 1985 r. do ponad 282 tys. w 2015 r. (Polski Związek Łowiecki, Warszawa, 2015). Regularne dokarmienie zwierząt przez służby leśne, dużą ilość naturalnej żywności i zmiany w rolnictwie związane z intensywną uprawą kukurydzy umożliwiły dzikom łatwy dostęp do pożywienia (*H-2: Żmudzki et al. Behawioryzm dzików w aspekcie szerzenia się czynników zakaźnych. Lecznica Dużych Zwierząt. 2016;1:29–35.*) Dodatkowo zwiększająca się liczba dzików może powodować bezpośrednie zagrożenie dla ludzi żyjących w regionach wysoko zurbanizowanych (Jensen et al. 2007). Z tych powodów niezbędne było oszacowanie odsetka zakażonych dzików, a tym samym ocena sytuacji epidemiologicznej z zakresie zakażeń leptospirozą w populacji dzików w Polsce. W tym celu w sezonie łowieckim 2012–2014 do badań pobrano 3621 próbek krwi pochodzących od dzików zlokalizowanych w 314 powiatach obejmujących 16 województw. Próbkę surowicy badano z wykorzystaniem odczynu aglutynacji mikroskopowej (OAM) z następującymi 10 serowarami Leptospir obejmujących 9 serogrup stwierdzonych w Europie: *Icterohaemorrhagiae* (szczep RGA, reprezentujący serogrupę *Icterohaemorrhagiae*),

Grippotyphosa (szczep Moskva V, serogrupa Grippotyphosa), Sejroe (szczep M84, serogrupa Sejroe), Tarassovi (szczep Perepelicyn, serogrupa Tarassovi), Pomona (szczep Pomona serogrupa Pomona), Canicola (szczep Hond Utrecht IV, serogrupa Canicola), Bratislava (szczep S / 820834, serogrupa Australis), Autumnalis szczep Akiyami, serogrupa Autumnalis), Hardjo (szczep Hardjoprajitno, serogrupa Sejroe) i Ballum (szczep MUS127, serogrupa Ballum) (OIE Leptospirosis manual, 2014). Szczepy referencyjne zostały dostarczone przez Wydział Nauk Weterynaryjnych, AFBI, Laboratorium Referencyjne OIE ds. Leptospirozy, Belfast. Badanie próbek przeprowadzono w Krajowym Laboratorium Referencyjnym (KLR) ds. Leptospirozy, w Zakładzie Chorób Świń, Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach, przy użyciu metody akredytowanej zgodnie z normą PN/EN ISO/IEC 17025–2005. W celu zapewnienia jakości badań KLR ds. Leptospirozy regularnie uczestniczy w międzynarodowych badaniach biegłości potwierdzających poprawność uzyskiwanych wyników badań.

Z pośród 3621 zbadanych próbek surowicy obecność przeciwciał przeciwko konkretnym serowarom leptospir stwierdzono w 377 próbkach (10,4%). Najwyższe odsetki seropozytywnych próbek występujących u dzików z wykorzystaniem w/w antygenów leptospir wykazano w następujących województwach: podkarpackim – 21,5%, lubelskim – 15,9%, śląskim – 15,6%, łódzkim – 14,4%, kujawsko–pomorskim – 14,2%, podlaskim – 11,7% i lubuskim – 10,6%, natomiast najniższe w małopolskim – 4,8%, warmińsko–mazurskim – 5,1% i świętokrzyskim – 5,1%. Wyniki badań wskazują, że częstość występowania próbek seropozytywnych w kierunku leptospirozy u dzików w Polsce jest podobna do wyników prezentowanych przez inne kraje europejskie, zwłaszcza w Hiszpanii – 12% (Vicente et al. 2002) i w Niemczech – 18% (Jansen et al. 2007). U naszych zachodnich sąsiadów stwierdzono wysoki odsetek zakażeń *Leptospira* spp. w pobliżu miasta Berlin (3,5 miliona osób). Podobnie stwierdzono wysoki odsetek pozytywnych próbek dla *Leptospira* spp. (15,5%) w aglomeracji śląskiej (2,7 mln osób) (Eurostat). Dane przedstawione w Niemczech i Polsce wskazują, że dziki występujące w pobliżu dużych miast o dużej gęstości zaludnienia mogą stanowić zagrożenie dla mieszkańców regionów wysoko zurbanizowanych (Jansen et al. 2007).

Obraz epidemiologiczny zakażeń *Leptospira* spp. jest w Europie zróżnicowany i w porównaniu do własnych wyników badań w innych krajach kształtował się następującym poziomem: w Portugalii (65,4%) (Vale–Goncalves et al. 2015), Słowenii (45,8%) (Vengust et al. 2008) i Chorwacji (31,9%) (Slavica et al. 2010). Z kolei niższe poziomy zakażenia stwierdzono we Włoszech – 2,6% (Montagnaro et al. 2010) oraz w Szwecji – 3,1% (Boqvist et al. 2012).

Wspomniana wcześniej, co raz większa liczba dzików powoduje częstsze kontakty między zwierzętami, co może prowadzić do zwiększenia rozprzestrzeniania się wielu zakażeń. Jednak stosunkowo wysoki odsetek zakażeń dzików spowodowanych leptospirozą (województwa podkarpackie, lubelskie, śląskie i łódzkie) nie jest powiązany z gęstością populacji tych zwierząt, co pozwala wysunąć hipotezę, że zakażenia u dzików mogą mieć charakter endemiczny.

Trudno jest określić, czy istnieje związek między zakażeniem występującym u świń, a dzikami. Według Wasińskiego i Pejsaka (2010) oraz Wasińskiego (2014), najczęściej występującymi serowarami w populacji świń w Polsce są Pomona i Sejroe, a w porównaniu z wynikami badań własnych poziom zakażenia tymi serowarami leptospir był niski i wynosił odpowiednio 3,1 i 0,2%.

Podsumowując, przedstawione dane wskazują, że w Polsce dziki narażone są na zakażenia różnymi serowarami leptospir. Powiększająca się populacja dzików może zwiększyć zagrożenie takich zakażeń u myśliwych i ludzi zamieszkujących duże aglomeracje miejskie. Badania wykazały, że dominującymi serowarami u dzików są Hardjo i Pomona. Szczególnie wysoką seroprewalencję dla Leptospiry stwierdzono w województwie podkarpackim. Dzikie są prawdopodobnie przypadkowym rezerwuarem serowaru Hardjo ze względu na to, że mają one częściej kontakt z bydłem niż trzodą chlewną. W odniesieniu do serowaru Pomona, wysoka seroprewalencja u świń pozwala spekulować, że dziki mogą być również chronicznie zakażone tym szczepem i mogą stanowić rezerwuuar tego serowaru. Jednakże epidemiologia zakażeń *Leptospira* spp. u dzików wymaga dalszych badań, a zwłaszcza powinna zostać potwierdzona przez izolację i typowanie szczepów *Leptospira* spp.

Stosunkowo wysoka prewalencja leptospirozy u dzików skłoniła nas do przeprowadzenia dalszych badań obejmujących inne zwierzęta łowne. Dlatego kolejnym etapem badań była ocena występowania zakażeń *Leptospira* spp. u jeleniowatych. Wyniki dotyczące tej części pracy opisałem w artykule **H-4: Żmudzki et al. First report of *Leptospira* infections in red deer, roe deer and fallow deer in Poland. *J Vet Res.* 2016;60:257–60.** W ostatnich dziesięciu latach populacja jeleni szlachetnych podwoiła się od 100 000 zwierząt w latach 2003–2004 do ponad 180 000 zwierząt w ciągu ostatnich dwóch lat. Podobna sytuacja wystąpiła u saren, gdzie odnotowano wzrost populacji od 600 000 do 800 000 (2003–2004) i odpowiednio u danieli od 7500 do 20 000 (2013–2014) (Stacja Badawcza PZŁ, Czempień, 2015). Ze względu na rosnącą populację tych zwierząt, transmisja leptospirozy do człowieka i innych gatunków jest wysoce prawdopodobna, w związku powyższym po raz pierwszy w Polsce podjęto próbę oceny sytuacji epidemiologicznej u tych gatunków zwierząt. W tym celu

w sezonie polowań 2014/2015 zebrano 147 próbek krwi od jeleni szlachetnych (*Cervus elaphus*) (n=103), saren europejskich (*Capreolus capreolus*) (n=37) i danieli zwyczajnych (*Dama dama*) (n=7) pochodzących z różnych regionów geograficznych Polski (12 województw). Próbkę surowicy badano przy pomocy OAM na obecność swoistych przeciwciał przeciwko następujących serowarom Leptospir: Icterohaemorrhagiae (szczep RGA, reprezentujący serogrupę Icterohaemorrhagiae), Grippytyphosa (szczep Moskwa V, serogrupa Grippytyphosa), Sejroe (szczep M84, serogrupa Sejroe), Tarassovi (szczep Perepelicyń, serogrupa Tarassovi), Pomona (szczep Pomona serogrupa Pomona), Canicola (szczep Hond Utrecht IV, serogrupa Canicola), Bratislava (szczep S / 820834, serogrupa Australis), Hardjo (szczep Hardjoprajitno, serogrupa Sejroe), Ballum (szczep MUS127, serogrupa Ballum), Zanoni (szczep Zanoni, serogrupa Pyrogenes), Hebdomadis (szczep Hebdomadis, serogrupa Hebdomadis) i Poi (szczep Poi, serogrupa Javanica). Spośród 147 próbek surowic przeciwciała przeciwko niektórym serowarom leptospir stwierdzono tylko w 7 próbkach (jeleń szlachetny – n=5, sarna europejska – n=1, daniel zwyczajny – n=1), dając ogólną prevalencję na poziomie 4,8% (0,95 CI: 1,9 – 9,6%) dla 12 z 16 badanych województw. Nie stwierdzono obecności przeciwciał przeciwko następującym serowarom leptospir: Icterohaemorrhagiae, Sejroe, Canicola, Bratislava, Hardjo, Ballum, Hebdomadis lub Poi. Próbkę dodatkowo stwierdzono w następujących województwach: dolnośląskie – 20,0% (0,95 CI: 2,5 – 55,6%) (Zanoni w mianie 100 i Pomona w mianie 400); Podkarpackie – 13,3% (0,95 CI: 1,7% – 40,5%) (w jednej próbce potwierdzono obecność przeciwciała przeciwko serowarom Pomona i Grippytyphosa, z tym samym mianie 100); Zachodniopomorskie – 18,2% (0,95 CI: 2,3% – 51,8%) (Zanoni w mianie 100 i Grippytyphosa w mianie 200); i Opolskie – 2,9% (0,95 CI: 0,1% – 15,3%) (Grippytyphosa w mianie 100), a w pozostałych ośmiu województwach nie stwierdzono przeciwciał przeciwko badanym serowarom leptospir.

W przeprowadzonym doświadczeniu oszacowano częstość występowania zakażeń patogennymi serowarami leptospir u jeleni szlachetnych, saren i danieli z różnych obszarów geograficznych na terenie kraju. Badane zwierzęta wykazywały seroreaktywność na poziomie 4,8% przy mianie 100 lub większym. Stwierdzono stosunkowo niskie miana przeciwciał, które nigdy nie przekraczały rozcieńczenia 400; W badaniach innych autorów miana przeciwciał osiągały rozcieńczenia na poziomie 3200 (Andreoli et al. 2014).

Obraz epidemiologiczny tych zakażeń w innych krajach europejskich jest podobny do wyników badań własnych. W Chorwacji (6,0%) (Slavica et al. 2008) i we Włoszech (6,3%) (Andreoli i wsp., 2014) wykazano porównywalny poziom zakażenia. W Hiszpanii Lavín i wsp. (1998) potwierdzili seroprevalencję u danieli na poziomie 12,9% dla testowanych serowarów

Leptospira spp., choć nie sprecyzowali, które serowary powszechnie występują na półwyspie iberyjskim. Z kolei a Espí i wsp. (2010) odnotowali u danieli częstość występowania o połowę niższą, z dominującym serowarem Pomona (5,8%) oraz serowarem Muenchen (2,6%) (serogrupa Australis), najczęściej występującym wśród jeleni szlachetnych na terenie Hiszpanii.

Dominującymi serowarami u jeleniowatych w Polsce są Grippotyphosa i Pomona, co jest zgodne z pracami innych autorów (Andreoli et al. 2014; Espí et al. 2010). Ekspozycja na te serowary nie jest przypadkowa, biorąc pod uwagę wcześniejsze badania w Polsce, gdzie serowary Grippotyphosa i Pomona również często stwierdzano u koni, świń (głównie serowar Pomona) oraz dzików (Arent et al. 2013b; Wasiński, 2005). Biorąc pod uwagę niską seroprewalencję i możliwość zakażenia różnymi serowarami, najprawdopodobniej dochodzi do przypadkowych infekcji, a jelenie szlachetne, sarny europejskie i danielie stanowią jedynie rezerwuar dla wspomnianych serowarów leptospir.

Podsumowując, przedstawione dane potwierdzają, niski poziom zakażenia *Leptospira* spp. wśród jeleniowatych w wielu krajach europejskich, w tym w Polsce. Wyniki wskazują również, że jeleniowate prawdopodobnie nie są ważnym wektorem w rozprzestrzenianiu się leptospirozy u ludzi pracujących w środowisku leśnym.

Ze względu na brak w piśmiennictwie krajowym publikacji dotyczących występowania leptospirozy u lisów oraz niewielką liczbą badań w tym zakresie na świecie postanowiono, że kolejnym etapem badań będzie ocena sytuacji epidemiologicznej w zakresie występowania leptospirozy u lisa rudego w Polsce. Wyniki tej pracy przedstawiłem w publikacji **H-5: Żmudzki et al. Seroprevalence of 12 serovars of pathogenic *Leptospira* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Poland. *Acta Vet Scand.* 2018;60:34.** Zasięg geograficzny populacji lisów (*Vulpes vulpes*) należących do rodziny psowatych jest jednym z największych spośród wszystkich drapieżników. Zwierzęta te głównie dzięki ogromnej zdolności adaptacyjnej do nowych środowisk, skolonizowały Eurazję, Amerykę Północną, Afrykę Północną i Australię. Dostępne dane wskazują, że populacja tych zwierząt w Polsce w 2015 r. została oszacowana na poziomie od 190 000 do 200 000 osobników (Stacja Badawcza PZŁ Czempień, 2015). Behawioryzm tych ssaków nieodłącznie związany jest ich drapieżnym stylem życia, stanowiąc poważne zagrożenie dla innych zwierząt i ludzi jako rezerwuar wielu chorób, w tym leptospirozy (National Geographic, 2017). Dlatego też celem badań była ocena występowania leptospirozy w populacji lisów na terenie kraju. Są to pierwsze badania przedstawiające sytuację epidemiologiczną zakażeń *Leptospira* spp. w populacji lisów w Polsce. Próbkę krwi (n = 2134) zebrano w sezonie łowieckim 2014–2015 w Polsce. Materiał biologiczny pochodził z 9

województw głównie z obszarów wschodniej i środkowej części kraju. Próbkę krwi od lisów pobierano z jamy klatki piersiowej i serca zwierząt. Próbkę surowic badano za pomocą OAM z wykorzystaniem 12 serowarów leptospir reprezentatywnych dla 10 serogrup stwierdzonych w Europie: Icterohaemorrhagiae (szczep RGA, reprezentujący serogrupę Icterohaemorrhagiae), Grippotyphosa (szczep Moskva V, serogrupa Grippotyphosa), Sejroe (szczep M84, serogrupa Sejroe), Tarassovi (szczep Perepelicy, serogrupa Tarassovi), Pomona (szczep Pomona, serogrupa Pomona), Canicola (szczep Hond Utrecht IV, serogrupa Canicola), Hardjo (szczep Hardjoprajitno, serogrupa Sejroe), Ballum (szczep MUS127, serogrupa Ballum), Australis (szczep Ballico, serogrupa Australis), Bataviae (szczep Swart, serogrupa Bataviae), Saxkoebing (szczep MUS 24, serogrupa Sejroe) i Poi (szczep Poi, serogrupa Javanica). Na podstawie przeprowadzonych badań obecność przeciwciał przeciwko testowanym serowarom leptospir stwierdzono w 561 próbkach (26,3%). Najwyższy odsetek zakażeń *Leptospira* spp. u lisa rudego stwierdzono na terenie województwa podkarpackiego (41,6%) i warmińsko-mazurskiego (40,3%), choć w innych województwach również wykazano wysoką seroprewalencję dla badanych serowarów leptospir. Wśród dominujących serowarów leptospir zaliczyć należy: Poi (12,42%), Saxkoebing (11,34%) i Sejroe (5,95%). Wymienione wyżej serowary wykazywały bardzo wysokie miana przeciwciał do 1: 25,600 u poszczególnych seropozytywnych zwierząt.

Badania serologiczne dowiodły, że lisy są często narażane ekspozycją na antygen różnych serowarów leptospir (Millán et al. 2009; Akerstedt et al. 2010; Slavica et al. 2008). Po raz pierwszy w Polsce wykonano badania serologiczne dotyczące występowania przeciwciał przeciwko szerokiej gamie serowarów leptospir w populacji lisów rudych w Europie Centralnej. Wysoka seroprewalencja (26,3%) u tego gatunku zwierząt w Polsce jest porównywalna do tej stwierdzonej w Hiszpanii (47,1%) (Millán et al. 2009) i Chorwacji (31,3%) (Slavica et al. 2008), ale znacząco wyższa niż w innych krajach europejskich, takich jak Niemcy (1,9%) (Müller, 1994) i Norwegia (9,9%) (Akerstedt et al. 2010). Teoretycznie każda patogenna leptospira może infekować zwierzęta gospodarskie, domowe i wolno żyjące, ale w praktyce tylko niewielka liczba serowarów występuje endemicznie w konkretnym regionie. Przeciwciała przeciw serowarowi Poi były najczęściej wykrywane w populacji lisa rudego w Polsce. Ekspozycja u tego gatunku zwierząt na wspomniany serowar nie jest zaskakująca, biorąc pod uwagę wyniki wcześniejszych badań przeprowadzonych w Polsce, u których w serogrupie Javanica, do której należy serowar Poi, również stwierdzano u koni, kóz i owiec (Arent et al. 2013a,c; Czopowicz et al. 2011; Krawczyk, 1999). Oprócz serowaru Poi u lisów wykazano obecność przeciwciał dla serowaru Sejroe. Jest to zgodne z innymi badaniami,

w których potwierdzono, że serowary Hardjo, Sejroe i Saxkoebing (wszystkie należące do serogrupy Sejroe) są szeroko rozpowszechnione u zwierząt w Europie (Little et al. 1986, 1987; Slavica et al. 2011; Lange et al. 1992). Reakcje OAM dla serowaru Hardjo powszechnie występujące u owiec i bydła (Little et al. 1986, 1987; Slavica et al. 2011) nie były powszechne u lisów. Obecność seropozytywnych zwierząt w tej serogrupie można przypisać głównie serowarom Sejroe lub Saxkoebing. Może to być związane z dietą lisów, ponieważ głównym źródłem pokarmu dla lisa rudego są dzikie małe ssaki, które są rezerwuarem serowarów Saxkoebing i Sejroe (Sebek et al. 1989). Przeciwciała przeciwko serogrupie Sejroe wykryto wcześniej w Polsce u świń, psów, koni i bydła, potwierdzając powszechną ekspozycję różnych gatunków zwierząt na leptospiry z tej serogrupy (Arent et al. 2013b,c; Krawczyk, 2005; Wasiński, 2007, 2014; Wasiński and Pejsak, 2010). Ponadto wskazuje to na endemiczne występowanie tego serowaru i możliwą rolę środowiska w transmisji patogenu. Obserwowane regionalne różnice w ekspozycji lisów na różne serowary leptospir mogą być związane z aktywnym krążeniem *Leptospira* spp. w środowisku (Moinet et al. 2010). Badania prowadzone w innych krajach europejskich dostarczają dowodów naukowych, że najczęstszym serowarem wśród lisów jest *Icterohaemorrhagiae* (Millán et al. 2009; Akerstedt et al. 2010; Slavica et al. 2008), który jednak w polskiej populacji lisa rudego wydaje się występować sporadycznie. Leptospiry wrażliwe są na wysychanie, a regionalne różnice w warunkach klimatycznych mogą mieć znaczący wpływ na ogólną seroprewalencję, a w szczególności na obecność niektórych serowarów. Pod tym względem Polska różni się od innych krajów, takich jak Hiszpania czy Chorwacja, gdzie badano seroprewalencję *Leptospira* spp. u lisów (Millán et al. 2009; Slavica et al. 2008).

W podsumowaniu należy wrazić pogląd, że lisy mogą być istotnym wektorem w szerzeniu leptospirozy u ludzi i zwierząt z względu na stosunkowo wysoką seroprewalencję sięgającą ponad 40% w województwie warmińsko–mazurskim i niemal 42% w województwie podkarpackim. Ponadto stosunkowo wysoki odsetek zakażeń serowarami Poi i Saxkoebing wynoszący odpowiednio 12,22 i 11,34% wskazuje że istnieje prawdopodobieństwo transmisji leptospir pomiędzy lisem, a człowiekiem. Ze względu na dość powszechne występowanie lisów, ich drapieżną naturę i zróżnicowaną dietę złożoną głównie z małych ssaków, można przyjąć, że są to zwierzęta indykatorowe (wskaźnikowe) zanieczyszczenia środowiska leptospirami. Zaprezentowane dane są również pewnym ostrzeżeniem dla mieszkańców dużych aglomeracji miejskich, gdyż odsetek zakażeń u lisów w województwie mazowieckim kształtował się na wysokim poziomie wynoszącym ponad 36%. Odnotowane wysokie miana przeciwciał wskazują, że lisy mogą stanowić zagrożenie dla innych zwierząt dziko żyjących i

gospodarskich, a także pośrednio dla człowieka. Interakcje między zwierzętami wymagają dalszych badań epidemiologicznych w celu wyjaśnienia roli dzikich zwierząt mięsożernych jako rezerwuaru rzadko występujących patogennych serowarów leptospir dla innych zwierząt i człowieka.

Osiągnięcia:

- Przeprowadzono na szeroką skalę badania (po raz pierwszy w kraju) nad występowaniem *Leptospira* spp. u dzików (*Sus scrofa*) w Polsce, które dostarczyły aktualnych danych dotyczących prewalencji tych krętków w naszym kraju. W Polsce dziki narażone są na zakażenia różnymi serowarami leptospir, a dominującymi serowarami u dzików są Hardjo, Pomona, Grippytyphosa i Bratislava. Szczególnie wysoką seroprewalencję dla leptospiry stwierdzono w województwie podkarpackim (21,5%). Ponadto wykazano że, stosunkowo wysoki odsetek dzików mających kontakt z leptospirozą w pobliżu dużych miast (aglomeracja śląska – 15,5%) o dużej gęstości zaludnienia może stanowić zagrożenie dla mieszkańców regionów wysoko zurbanizowanych.
- Po raz pierwszy w Polsce podjęto próbę oceny sytuacji epidemiologicznej na podstawie badań serologicznych jeleni szlachetnych (*Cervus elaphus*), saren europejskich (*Capreolus capreolus*) i danieli zwyczajnych (*Dama dama*) pochodzących z różnych regionów geograficznych Polski. Badania wykazały, że dominującymi serowarami są Grippytyphosa i Pomona. Stwierdzono stosunkowo niską seroprewalencję na poziomie 4,8% dla badanych serowarów leptospir wśród jeleniowatych w Polsce. Wykazano, że zwierzęta te prawdopodobnie nie są ważnym wektorem w rozprzestrzenianiu się leptospirozy u innych gatunków zwierząt i ludzi pracujących w środowisku leśnym.
- Po raz pierwszy w Polsce wykonano badania serologiczne dotyczące występowania przeciwciał przeciwko szerokiej gamie serowarów leptospir w populacji lisów rudych (*Vulpes vulpes*) w tej części Europy. Najczęściej wstępującymi serowarami u lisów są Poi, Saxkoebing i Sejroe. Stwierdzona wysoka seroprewalencja (26,3%), drapieżny styl życia i zróżnicowana dieta (głównie gryzonie) lisów stanowi swego rodzaju wskaźnik zanieczyszczenia środowiska leptospiarami, co przekłada się na potencjalne ryzyko zakażenia człowieka i innych gatunków mających kontakt z tymi zwierzętami.

Piśmiennictwo

- Akerstedt J, Lillehaug A, Larsen IL, Eide NE, Arnemo JM, Handeland K. Serosurvey for canine distemper virus, canine adenovirus, *Leptospira interrogans*, and *Toxoplasma gondii* in free-ranging canids in Scandinavia and Svalbard. *J Wildl Dis.* 2010;46:474–80.
- Andreoli E, Radaelli E, Bertolotti I, Bianchi A, Scanziani E, Tagliabue S, Mattiello S. *Leptospira* spp. infection in wild ruminants: a survey in Central Italian Alps. *Vet Ital* 2014;50:285–91.
- Arent Z, Frizzell C, Gilmore C, Mackie D, Ellis WA. Isolation of leptospires from genital tract of sheep. *Vet Rec.* 2013a;173:582.
- Arent ZJ, Andrews S, Adamama-Moraitou K, Gilmore C, Pardali D, Ellis WA. Emergence of novel *Leptospira* serovars: a need for adjusting vaccination policies for dogs? *Epidemiol Infect* 2013b;141:1148–53.
- Arent ZJ, Kedzierska-Mieszkowska S. Seroprevalence study of leptospirosis in horses in northern Poland. *Vet. Rec.* 2013c;172:269.
- Assez N, Mauriauourt P, Cuny J, Goldstein P, Wiel E. Fever and jaundice and if it was a leptospirosis. About a case of *L. interrogans icterohaemorrhagiae* in Northern France. *Ann Fr Anesth Reanim.* 2013;32:439–43.
- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis.* 2003;3:757–71.
- Boqvist S, Bergström K, Magnusson U. Prevalence of antibody to six *Leptospira* serovars in Swedish wild boars. *J Wildl Dis.* 2012;48:492–6.
- Cerri D, Ebani V.V, Fratini F, Pinzauti P, Andreani E. Epidemiology of leptospirosis: observations on serological data obtained by a “diagnostic laboratory for leptospirosis” from 1995 to 2001. *New Microbiol.* 2003;26:383–89.
- Ciceroni L, Stepan E, Pinto A, Pizzocaro P, Dettori G, Franzin L, et al. Epidemiological trend of human leptospirosis in Italy between 1994 and 1996. *Eur J Epidemiol.* 2000;16:79–86.
- Czopowicz M, Kaba J, Smith L, Szalus-Jordanow O, Nowicki M, Witkowski L. Leptospiral antibodies in the breeding goat population of Poland. *Vet Rec.* 2011;169:230–4.

- Deutz A, Fuchs K, Schuller W, Nowotny N, Auer H, Aspöck H, Stünzner D, Kerbl U, Klement C, Köfer J. Seroepidemiological studies of zoonotic infections in hunters in southeastern Austria-prevalences, risk factors, and preventive methods. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2003;116:306–11.
- Ebani VV, Cerri D, Poli A, Andreani EJ. Prevalence of *Leptospira* and *Brucella* antibodies in wild boars (*Sus scrofa*) in Tuscany, Italy. *Wildl Dis.* 2003;39:718–22.
- Ellis WA. Animal Leptospirosis. In: *Leptospira and Leptospirosis*, Adler B, editor. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 387, doi:10.1007/978-3-662-45059-8_1. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015. p. 99–137.
- Ellis WA. Leptospirosis: *Leptospira* spp. serovars Pomona, Kennewicki, Bratislava, Muenchen, Tarassovi, Canicola, Grippotyphosa, Hardjo, others—abortion and stillbirths In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, editors. *Diseases of swine 10th edition*; 2012 John Wiley & Sons, Inc. 2012. p. 770–78.
- Espí A, Prieto J.M, Alzaga V. Leptospiral antibodies in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*), fallow deer (*Dama dama*) and European wild boar (*Sus scrofa*) in Asturias, Northern Spain. *Vet J*; 2010;183:226–27.
- Fiecek B, Chmielewski T, Sadkowska-Todys M, Czerwiński M, Zalewska G, Roguska U, Tylewska-Wierzbanowska S. An outbreak of leptospirosis imported from Germany to Poland. *Adv Clin Exp Med.* 2017;26:415–19.
- Fiecek B, Grochowalska A, Chmielewski T, Tylewska-Wierzbanowska S. *Leptospira* spp. and *Coxiella burnetii* infections occurring in Radomskie District in people of selected professional groups. *Przeegl Epidemiol.* 2012;66:605–10.
- Fiecek B, Tylewska-Wierzbanowska S. Krętki *Leptospira* spp. – chorobotwórczość i diagnostyka zakażeń. *Post. Mikrobiol.* 2014;53:113–22.
- Forbes AE, Zochowski WJ, Dubrey SW, Sivaprakasam V. Leptospirosis and Weil's disease in the UK. *QJM.* 2012;105:1151–62.
- Gliński Z, Kostro K. Leptospiroza – groźna choroba zwierząt i zoonoza. *Życie Wet.* 2013;88:835–41.
- Janowski H, Szweda W, Janowski TE. (red.). *Leptospiroza świń w: Szczegółowa patologia i terapia chorób świń, część II, wyd. II, Akademia Rolniczo–Techniczna im. M. Oczapowskiego w Olsztynie, Wydawnictwo ART., 1997 r., Olsztyn.*

- Jansen A, Luge E, Guerra B, Wittschen P, Gruber AD, Loddenkemper C, Schneider T, Lierz M, Ehlert D, Appel B, Stark K, Nöckler K. Leptospirosis in urban wild boars, Berlin, Germany. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:739–42.
- Krawczyk M. Serological evidence of leptospirosis in animals in northern Poland. *Vet Rec.* 2005;156:88–9.
- Krawczyk M. Serological studies on leptospirosis in sheep. *Med Wet.* 1999;55:397–99.
- Lange S. Seroepidemiological studies of the detection of leptospire of the sejroe group in cattle in middle Thuringia. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 1992;105:374–7.
- Lavín S, Ruiz-Bascará M, Marco I, Viñas L. Ecopatología del gamo (*Dama dama*) en el Principado de Asturias. *Vet Castilla León.* 1998;9:15–18.
- Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14:296–326.
- Little TW, Stevens AE, Hathaway SC. Serological studies on British isolates of the Sejroe serogroup I. The identification of British isolates of the Sejroe serogroup by the cross agglutinin absorption test. *J Hyg (Lond).* 1986;97:123–31.
- Little TW, Stevens AE, Hathaway SC. Serological studies on British isolates of the Sejroe serogroup of leptospira II. An evaluation of the factor analysis method of identifying leptospire using strains belonging to the Sejroe serogroup. *Epidemiol Infect.* 1987;99:107–15.
- Millán J, Candela MG, López-Bao JV, Pereira M, Jiménez MA, León-Vizcaíno L. Leptospirosis in wild and domestic carnivores in natural areas in Andalusia, Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2009;9:549–54.
- Moinet M, Fournier-Chambrillon C, André-Fontaine G, Aulagnier S, Mesplède A, Blanchard B. Leptospirosis in free-ranging endangered European mink (*Mustela lutreola*) and other small carnivores (*Mustelidae*, *Viverridae*) from southwestern France. *J Wildl Dis.* 2010;46:1141–51.
- Montagnaro S, Sasso S, De Martino L, Longo M, Iovane V, Ghiurmino G, et al. Prevalence of antibodies to selected viral and bacterial pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) in Campania Region, Italy. *J Wildl Dis.* 2010;46:316–19.
- Müller H, Winkler P. Results of serological studies of *Leptospira* antibodies in foxes. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 1994;107:90–3.

- National Geographic. Animals. Washington, D.C. 2017. <https://www.nationalgeographic.com/animals/mammals/r/red-fox/>. Accessed 04 Mar 2018.
- OIE Terrestrial Manual 2014. Chapter 2.1.12. Leptospirosis. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.12_LEPTO.pdf. Accessed 04 Mar 2018.
- Pejsak Z. Leptospiroza w: Ochrona zdrowia świń, wyd. I, Polskie Wydawnictwo Rolnicze Sp. z o.o., 2007 r., Poznań.
- Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med Mal Infect.* 2013;43:1–9.
- Polish Hunting Association–PZL. Warsaw. 2015. http://www.czempin.pzlow.pl/palio/html.run?_Instance=pzl_www&_PageID=21&_CAT=CZEMPIN.MATERIALY. Accessed 04 Mar 2018.
- Schoonman L, Swai ES. Risk factors associated with the seroprevalence of leptospirosis, amongst at-risk groups in and around Tanga city, Tanzania. *Ann Trop Med Parasitol.* 2009;103:711–8.
- Sebek Z, Sixl W, Sixl-Voigt B, Köck M, Stünzner D, Valova M. First evidence of the leptospirosis natural foci of the serotype Saxkoebing in Austria. *Geogr Med Suppl.* 1989;2:17–22.
- Slavica A, Cvetnić Ž, Konjević D, Janicki Z, Severin K, Deždek D, et al. Detection of *Leptospira* spp. serovars in wild boars (*Sus scrofa*) from continental Croatia. *Veterinarski Arhiv.* 2010;80:247–57.
- Slavica A, Deždek D, Konjevic D, Cvetnic Z, Sindicic M, Stanin D. Prevalence of leptospiral antibodies in the red fox (*Vulpes vulpes*) population of Croatia. *Vet Med (Praha).* 2011;56:209–13.
- Slavica Ž, Cvetnić Z, Milas Z, Janicki Z, Turk N, Konjević D, et al. Incidence of leptospiral antibodies in different game species over a 10-year period (1996–2005) in Croatia. *Eur J Wildl Res.* 2008;54:305–11.
- Stacja Badawcza PZŁ, Czempin. Sytuacja Zwierząt Łownych w Polsce 2013 (Polish Game Hunting Report 2013).
- Vale-Gonçalves HM, Cabral JA, Faria MC, Nunes-Pereira M, Faria AS, Veloso O, et al. Prevalence of *Leptospira* antibodies in wild boars (*Sus scrofa*) from Northern Portugal: risk factor analysis. *Epidemiol Infect.* 2015;143:2126–30.

- Vengust G, Lindtner-Knific R, Zele D, Bidovec A. Leptospira antibodies in wild boars (*Sus scrofa*) in Slovenia. Eur J Wildl Res. 2008;54:749–52.
- Vicente J, León-Vizcaíno L, Gortázar C, José Cubero M, González M, Martín-Atance P. Antibodies to selected viral and bacterial pathogens in European wild boars from southcentral Spain. J Wildl Dis. 2002;38:649–52.
- Vijayachari P, Sugunan AP, Shriram AN. Leptospirosis: an emerging global public health problem. J Biosci. 2008;33:557–69.
- Wasiński B, Dutkiewicz J. Leptospirosis—current risk factors connected with human activity and the environment. Ann Agric Environ Med. 2013;20:239–44.
- Wasiński B, Pejsak Z. Occurrence of leptospiral infections in swine population in Poland evaluated by ELISA and microscopic agglutination test. Pol J Vet Sci. 2010;13:695–99.
- Wasiński B, Pejsak Z. Reactivity of heat-stable *Leptospira* antigenic preparation used in enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies in swine serum. Pol J Vet Sci. 2012;15:31–6.
- Wasiński B. Infections of swine caused by *Leptospira* serovars of serogroup Sejroe – possibilities of recognition with the use of PCR. Bull Vet Inst Pulawy. 2014;58:521–26.
- Wasiński B. Occurrence of *Leptospira* sp. antibodies in swine in Poland. Bull Vet Inst. Pulawy. 2007;51:225–28.
- Wasiński B. Occurrence of *Leptospira* serovars in pigs in the years 2002–2003. Medycyna Weter. 2005;61:46–9.
- Wijaszka T, Truszczyński M. Nowa lista chorób zgłaszanych do OIE. Medycyna Weter. 2008;62:1455.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych (artystycznych)

Od początku pracy którą rozpocząłem w 1999 roku biorę aktywny udział w działalności naukowej Zakładu Chorób Świń. W ciągu blisko 19 lat pracy uczestniczyłem w realizacji 21 zadań i projektów badawczych. Były to m.in. tematy wynikające z działalności statutowej Instytutu. Uczestniczyłem w realizacji 15 tego typu zadań (w 4 jako kierownik tematu). Ich tematyka obejmowała m.in. udziału *Clostridium* spp. w etiologii zespołu zaburzeń alimentarnych u prosiąt, warchlaków i tuczników, opracowaniu alternatywnych metod wykrywania *Lawsonia intracellularis* (*L. intracellularis*), a także opracowaniu i zastosowaniu

techniki multiplex PCR do wykrywania metycylino – opornych gronkowców złocistych (MRSA). Ponadto, uczestniczyłem w realizacji dwóch tematów programu wieloletniego (2014–2018), które obejmowały swoją tematyką ocenę sytuacji epidemiologicznej w zakresie leptospirozy u świń, koni i bydła oraz oporności bakterii na powszechnie stosowane substancje antybakteryjne w populacji trzody chlewnej.

Brałem również udział w 6 grantach (w 2 jako kierownik tematu, a w 3 jako główny wykonawca). Ich tematyka dotyczyła m.in. opracowanie metod umożliwiających laboratoryjną diagnostykę molekularną enteropatii krwotocznych w tym przede wszystkim ich rozpoznawanie różnicowe, określenie lekooporności krajowych szczepów *Brachyspira hyodysenteriae* (*B. hyodysenteriae*) oraz charakterystykę, na poziomie fenotypowym i molekularnym, populacji *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) opornych na metycylinę (MRSA) u trzody chlewnej i ludzi mających z nią kontakt w Polsce.

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 Chorób Świń.

Tematykę mojej działalności badawczej (z wyłączeniem prac opisanych w osiągnięciu habilitacyjnym) można podzielić na następujące główne kierunki.

Enteropatie krwotoczne świń (*L. intracellularis*, *B. hyodysenteriae*) – diagnostyka różnicowa, występowanie, przebieg, oddziaływanie na organizm, lekooporność oraz immunoprofilaktyka

W pierwszym okresie pracy naukowej moje zainteresowania skupiły się na zagadnieniach związanych z enteropatiami krwotocznymi u świń. Enteropatie krwotoczne, a wśród nich rozrostowe zapalenie jelit (*porcine proliferative enteritis* – PPE) i dyzenteria świń (*swine dysentery* – SD), to choroby przewodu pokarmowego, których głównym objawem klinicznym są biegunki zawierające niekiedy domieszkę krwi. Rozrostowe zapalenie jelit określane jest również jako: zapalenie jelita biodrowego (*ileitis*), rozrostowa enteropatia jelit (*proliferative enteropathy* – PE) lub adenomatoza. Dyzenteria występuje również pod nazwą krwotoczno – martwicowego zapalenia żołądka i okrężnicy (*gastrocolitis haemorrhagica necroticans suum*). Enteropatie krwotoczne stanowią poważny problem w rodzimej hodowli trzody chlewnej

Dyżenteria świń ujawnia się przede wszystkim w gospodarstwach o niskim poziomie higieny, podczas gdy PE jest chorobą typową dla gospodarstw charakteryzujących się wysokim standardem organizacji produkcji i higieny środowiska. Uporczywe biegunki, zahamowanie przyrostów masy ciała (m.c.), pogorszenie współczynnika zużycia paszy, zróżnicowanie wagowe tuczników oraz występowanie zmian o charakterze krwotocznym determinują zmniejszenie opłacalności produkcji w chlewniach dotkniętych tymi chorobami. Biorąc pod uwagę, podobny w niektórych okolicznościach, obraz kliniczny i sekcyjny obu jednostek chorobowych, w ostatecznym rozpoznawaniu konieczne jest przeprowadzenie diagnostycznych różnicowych badań laboratoryjnych. W związku z tym, że w Polsce praktycznie w żadnym krajowym laboratorium nie prowadzono rutynowych badań ukierunkowanych na diagnostykę różnicową dyżenterii i adenomatozy świń podjąłem próbę opracowania metod wykorzystujących technikę reakcji polimeryzacji łańcuchowej (PCR). Dlatego celem badań było opracowanie szybkich i wiarygodnych metod wykrywania i różnicowania bakterii *L. intracellularis* i *B. hyodysenteriae* oraz sprawdzenie przydatności metod w regularnych badaniach diagnostycznych. Podjęcie badań uzasadnić można było w pierwszej kolejności dynamicznym narastaniem problemu rozrostowego zapalenia jelit w kraju oraz ciągłym utrzymywaniem się w wielu stadach chronicznej postaci dyżenterii świń, którą w badaniu klinicznym i sekcyjnym trudno było odróżnić od adenomatozy. Biorąc pod uwagę powszechne występowanie tych chorób konieczne było, z epidemiologicznego i terapeutycznego punktu widzenia, dysponowanie techniką laboratoryjną umożliwiającą różnicową diagnostykę enteropatii krwotocznych świń. Celowość podjęcia zaprezentowanych badań wynikała również z faktu stosunkowo słabego zaplecza w odniesieniu do diagnostyki laboratoryjnej przedstawionych enteropatii wynikającej głównie z zastosowania tradycyjnych metod hodowlanych obarczonych długotrwałą i uporczywą hodowlą niejednokrotnie kończąca się niepowodzeniem (*B. hyodysenteriae*). Ponadto hodowla komórkowa *in vitro* *L. intracellularis* do chwili obecnej jest niezwykle trudna i nieliczne laboratoria na świecie zajmują się doświadczalnie hodowlą tego drobnoustroju. Ze względu na ograniczenia związane z zastosowaniem metod bakteriologicznych, opracowałem szereg technik PCR umożliwiających wykrywanie i różnicowanie bakterii *L. intracellularis* i *B. hyodysenteriae*. Reakcje PCR wykonywano metodą standardową, przy użyciu pojedynczej pary starterów oraz metodą multiplex, w której w jednej mieszaninie reakcyjnej znajdowały się pary starterów do wykrywania *L. intracellularis* i *B. hyodysenteriae*. Ponadto do wykrywania *L. intracellularis* zastosowano metodę jedno próbówkową nested PCR której czułość umożliwiła wykrycie $1,1 \times 10^2$ CFU/ml zarówno w próbce zawiesiny bakterii, jak i w próbce kału zawierającego inhibitory

reakcji PCR. W wyniku przeprowadzonych testów wykazałem przewagę nested PCR nad jednoetapowym PCR. Obecność kału w materiale poddawany ekstrakcji powodowała 100 – krotne obniżenie czułości jednoetapowego PCR ($1,1 \times 10^3$ CFU/ml dla zawiesiny kału). Czułość PCR do wykrywania *B. hyodysenteriae* wynosiła 2×10^3 CFU/ml zarówno dla hodowli bakteryjnej, jak i również w odniesieniu do próbek kału. W reakcji multiplex PCR zaobserwowano 10 – krotny spadek czułości w wykrywaniu *L. intracelularis* i 100 – krotny spadek w odniesieniu do *B. hyodysenteriae*, w porównaniu do czułości reakcji z pojedynczą parą starterów. Wyniki badań jednoznacznie potwierdziły przydatność w rutynowych badań diagnostycznych jednoetapowej techniki PCR i jedno próbówkowej metody nested PCR do wykrywania odpowiednio *B. hyodysenteriae* i *L. intracelularis*. Powyższe metody obecnie zostały unowocześnione i do chwili obecnej wykorzystywany jest real-time PCR do wykrywania materiału genetycznego *B. hyodysenteriae* i *L. intracelularis*. Opracowane metody zostały wprowadzone jako procedury badawcze do rutynowego badania kału warchlaków i tuczników i są obecnie w trakcie procesu akredytacji. Badania dotyczące dyzenterii świń i rozrostowego zapalenia jelit były wykonywane w większości w ramach mojej pracy doktorskiej, której promotorem był Pan prof. dr hab. Zygmunt Pejsak.

Opracowanie i wdrożenie do codziennej diagnostyki technik PCR umożliwiającej detekcję i różnicowanie w/w enteropatii krwotocznych pozwoliło na przeprowadzenie kolejnych badań, których celem było określenie częstotliwości występowania *B. hyodysenteriae* i *L. intracelularis* w chlewniach o cyklu zamkniętym w których rejestrowano objawy kliniczne wskazujące na enteropatie krwotoczne. Na podstawie analizy ankiet, spośród 200 średnio – i wielkotowarowych gospodarstw trzody chlewnej, do badań zakwalifikowano 66 ferm. Gospodarstwa podzielono na 2 grupy: średnio – towarowe do 100 macior – 26 gospodarstw i wielkotowarowe powyżej 100 macior – 40 gospodarstw. Wielkość stada podstawowego była zróżnicowana z najmniejszym liczącym 4 maciory do największego 2500 samic. Do badań pobrano łącznie 1188 próbek kału (18 próbek z gospodarstwa). Materiał pobierano 5–6 tuczników, wykazujących objawy biegunki oraz od świń, u których biegunka nie występowała, lecz ich kondycja fizyczna wskazywała na występowanie zaburzeń w stanie zdrowia. W badaniach wykorzystano jednoetapowy PCR do wykrywania materiału genetycznego *B. hyodysenteriae* oraz jedno próbówkowy nested PCR do wykrywania materiału genetycznego *L. intracelularis*. Obecność *L. intracelularis* stwierdzono w 133 z 396 badanych próbek kału (33,58%). Odsetek ferm, w których stwierdzono wymieniony drobnoustrój wynosił 62,12%. *B. hyodysenteriae* wykryto w 54 z 396 badanych próbek kału (13,63%). Spośród 66 badanych ferm podejrzanych o występowanie dyzenterii świń 21 (31,81%) było dodatnich. Infekcje

mieszane *L. intracellularis* i *B. hyodysenteriae* stwierdzono w 12 (18,18%) gospodarstwach. Analizując współzależność między wielkością ferm, a stopniem ich zakażenia wykazano, że w stadach do 100 macior loch odsetek ferm zainfekowanych *L. intracellularis* wynosił 46,15%, a w odniesieniu do *B. hyodysenteriae* 26,92. W fermach powyżej 100 loch odpowiednie wskaźniki kształtowały się na poziomie 72,5% i 35,0%. Z badań wynika również, że występowanie (*ang.* occurrence) zakażeń *L. intracellularis* w średnio – i wielkotowarowych gospodarstwach o cyklu zamkniętym było znacząco wyższe od poziomu zakażeń *B. hyodysenteriae*. Podsumowując stwierdzono, że *L. intracellularis* i *B. hyodysenteriae* są powszechnie rozprzestrzenione w populacji świń w Polsce. Między wielkością stad, a częstotliwością ich zakażenia wymienionymi bakteriami występuje ścisła korelacja. Możliwe jest także występowanie mieszanych zakażeń świń tymi drobnoustrojami.

Badania dotyczące występowania zakażeń *L. intracellularis* w krajowej populacji świń skłoniły nas do poszukiwania alternatywnych metod diagnostycznych umożliwiających wykrywanie zakażeń wywołanych przez *L. intracellularis*. W tym celu opracowano metody immunohistochemiczne (IHC) do wykrywania *L. intracellularis* w utrwalonych w formalinie, zatopionych w parafinie odcinkach jelita od świń i wdrożenie tej metody w diagnostyce różnicowej enteropatii krwotocznych świń. Badanie przeprowadzono na 165 odcinkach jelita (jelita biodrowego, ślepego i okrężnicy) zebranych od 76 świń, reprezentujących 42 gospodarstwa trzody chlewnej. Zwierzęta uwzględnione w analizie wykazywały objawy kliniczne charakterystyczne dla rozrostowego zapalenia jelit w postaci biegunki, kału z domieszką krwi w kolorze szarym lub brązowym. Skrawki jelit analizowano na obecność *L. intracellularis* za pomocą techniki PCR i IHC. Spośród 165 próbek wycinków jelit od świń z biegunką, DNA *L. intracellularis* wykryto metodą PCR w 33 (20,0%) próbkach. W tej grupie 30 próbek (18,2% wszystkich badanych próbek) również było pozytywnych w IHC, a tylko 3 (1,8%) były ujemne w IHC. Sto trzydzieści dwie (80,0%) próbki miały wynik negatywny w obu testach. próbki dodatnie w metodzie PCR i IHC pochodziły z 8 gospodarstw od 11 świń w wieku od 4 do 20 tygodni. Antygen *L. intracellularis* był widoczny w IHC głównie w kryptach jelitowych i/lub w komórkach jednojądrzastych obecnych w blaszce właściwej. Pozytywny reakcja IHC widoczna w komórkach nabłonkowych tuż przy świetle krypt tworzyła charakterystyczny dla tej bakterii obraz zabarwionego rąbka nabłonka jelitowego. Wyniki niniejszego badania dodatkowo potwierdziły przydatność IHC w wykrywaniu antygenu *L. intracellularis* w tkankach jelit.

Następnie we współpracy z Katedrą Morfologii Funkcjonalnej oraz Zespołu Anatomii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko Mazurskiego w Olsztynie z zespołem badawczym Prof. dr

hab. Mirosława Łakomego, Prof. dr hab. Krzysztofa Wąsowicza i Prof. dr hab. Jerzego Kaleczyca uczestniczyłem w badaniach dotyczących wpływu eksperymentalnej infekcji *B. hyodysenteriae* na unerwienie autonomiczne węzłów chłonnych i płytki chłonnej biodrowo – ślepej świni, oraz na wybrane subpopulacje limfocytów w tych elementach układu immunologicznego. Wykazano, że dyzenteria świń powodowała wyraźny wzrost stężenia SP (*ang.* Substance P; Gut – Brain Peptides) i Gal (*ang.* Galanin neuropeptide) w biodrowo – ślepych węzłach chłonnych i płycie chłonnej biodrowo – ślepej. Stan zapalny powodował również wyraźny spadek liczby limfocytów CD21+ (B) i TCR gamma_delta+/CD8 – (uważanych za komórki „natural killer”) oraz wzrost liczby limfocytów CD4+/CD8+ (ale tylko w węzłach chłonnych).

Biorąc pod uwagę potrzeby rynku i prowadzone rozmowy i konsultacje z terenowymi lekarzami weterynarii specjalistami chorób trzody chlewnej zgłaszających wielokrotnie brak skuteczności leczenia klinicznych postaci dyzenterii świń i w związku z tym narastającą opornością krajowych szczepów *B. hyodysenteriae*, zaistniała potrzeba wdrożenia do rutynowego stosowania metod ilościowego określenia lekooporności szczepów *B. hyodysenteriae*. W związku z powyższym moje zainteresowania skupiły się również na poszukiwaniu nowych i precyzyjnych metod diagnostycznych dotyczących oznaczania lekowrażliwości terenowych szczepów *B. hyodysenteriae*.

Oznaczanie lekowrażliwości jest bardzo ważnym etapem diagnostyki mikrobiologicznej. Powszechne stosowanie chemioterapeutyków powoduje wzrost oporności wielu patogennych drobnoustrojów, a także pojawienie się nowych mechanizmów oporności. W ostatnich latach w większości krajów Unii Europejskiej obserwuje się niepokojące zjawisko narastania oporności na stosowane w leczeniu dyzenterii świń antybiotyki. Krótkotrwałe stosowanie zaniżonych dawek antybiotyku prowadzi do powstania oporności na najczęściej stosowane antybiotyki. Do terapii dyzenterii świń zaleca się: tiamulinę, walnemulinę, tylozynę, doksycyklinę i linkomycynę. W Polsce lekiem z wyboru w leczeniu wspomnianej jednostki chorobowej jest tiamulina. Wcześniej wspomniane konsultacje prowadzone z lekarzami weterynarii dały ogólny pogląd na temat lekooporności krętków *B. hyodysenteriae*, jednak brakowało precyzyjnych danych świadczących o rzeczywistej skuteczności omawianych antybiotyków.

W związku z powyższym celem badań było wdrożenie metod diagnostycznych pozwalających na określenie minimalnych stężeń hamujących (minimal inhibitory concentration – MIC) dla poszczególnych chemioterapeutyków wykorzystywanych w zwalczaniu dyzenterii świń. Oznaczenie lekooporności krajowych szczepów *B. hyodysenteriae*

metodą mikro rozcieńczeń w bulionie, przeprowadzono po raz pierwszy w Polsce a wynika to z faktu, że hodowla wspomnianych krętków jest niezwykle pracochłonna, długotrwała, uciążliwa i niejednokrotnie kończąca się utratą cennego szczepu w kolejno po sobie wykonywanych pasażach. Ponadto badania te umożliwiły monitorowanie sytuacji w zakresie antybiotykowrażliwości krajowych izolatów *B. hyodysenteriae*.

Do badań wykorzystano 21 szczepów *B. hyodysenteriae* pozyskanych z 66 gospodarstw trzody chlewnej pochodzących z typowych przypadków terenowych, w których badaniem klinicznym i anatomopatologicznym tuczników stwierdzono charakterystyczne zmiany wskazujące na występowanie dyzenterii świń. Do badań wykorzystano próbki kału, wymazy z odbytu i podwiązane odcinki okrężnicy i jelita ślepego. Kolonie bakteryjne posiewano na podłoże TSA (*ang.* trypticase soy agar) z krwią i chlorowodorkiem cysteiny.

Przed wprowadzeniem terenowej hodowli szczepów *B. hyodysenteriae* na mikropłytki do oznaczania antybiotykowrażliwości wykonano szereg pasaży aż do uzyskania jednorodnej, beta – hemolitycznej kultury bakteryjnej. Następnym etapem była analiza biochemiczna uwzględniająca ocenę stopnia hemolizy (silnej β – hemolizy) występującej wokół kolonii *B. hyodysenteriae* jako istotnego elementu ułatwiającego klasyfikację. Po uzyskaniu jednorodnej hodowli bakteryjnej w celu zakwalifikowania drobnoustroju do określonego gatunku *Brachyspira* spp. każdorazowo wykonano dodatkowe badania biochemiczne polegające na określeniu zdolności krętków *B. hyodysenteriae* do wytwarzania indolu według metody "spot test".

Ostatecznie przynależność do gatunku *B. hyodysenteriae* potwierdzono techniką real time PCR umożliwiającą amplifikację konserwatywnego genu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADH) *B. hyodysenteriae*.

Do oznaczenia wrażliwości szczepów *B. hyodysenteriae* na wybrane chemioterapeutyki (tiamulina, walnemulina, doksycyklina, linkomycyna, tylozyna i ampicylina) wybrano metodę mikrorozcieńczeń w bulionie mózgowo – sercowym (BHI – brain heart infusion) z dodatkiem 10% cielęcej surowicy płodowej (VetMICTM *Brachyspira*). W technice tej na mikropłytki opłaszczono antybiotykiem w serii dwukrotnych rozcieńczeń w arytmetycznie rosnących stężeniach wprowadzając zawiesinę badanych bakterii (3 – dniowa jednorodna hodowla *B. hyodysenteriae* uzyskana z podłożu TSA). Następnie mikropłytki inkubowano się w warunkach beztlenowych. Za najmniejsze stężenie hamujące przyjmowano koncentrację chemioterapeutyku, w obecności której nie stwierdzano widocznego wzrostu drobnoustrojów.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że wszystkie szczepy *B. hyodysenteriae* były w pełni wrażliwe na działanie tiamuliny. Ponad połowa badanych izolatów

(57,1%) wykazywało wartości MIC na poziomie 0,5 µg/ml przy wartości granicznej dla tiamuliny (pełnej wrażliwości drobnoustroju na testowany antybiotyk) wynoszącej ≤ 1 µg/ml, podczas gdy jedna trzecia szczepów (28,6%) prezentowała wartości MIC na poziomie 1,0 µg/ml. W przypadku walnemuliny, wykazano zaskakująco niższą aktywność przy identycznej wartości granicznej, gdzie 66,8% szczepów uznano za wrażliwe a 33,2% za średnio-wrażliwe. W przypadku doksycykliny 80,9% izolatów wykazywała wartości MIC na poziomie 1–2 µg/ml, co według wartości granicznych wyznaczonych przez Pringle i wsp., (2007) lokowało badane szczepy jako średnio – wrażliwe. Najniższą aktywność wobec badanych szczepów *B. hyodysenteriae* wykazała tylozyna. Potwierdzono całkowitą oporność wszystkich badanych szczepów, przy czym u 85,6% z nich, stwierdzano wartości MIC (>128 µg/ml) znacznie przekraczające ustalone koncentracje tylozyny w zaprojektowanym panelu VetMIC™ Brachyspira. W przypadku linkomycyny, zaledwie 9,6% krętków uznano za wrażliwe na działanie antybiotyku przy wartości granicznej ≤ 4 µg/ml. Wszystkie izolaty *B. hyodysenteriae* wykazały całkowitą wrażliwość wobec ampicyliny przy wartości granicznej ≤ 1 µg/ml, lecz należy zaznaczyć normy wrażliwości w/w antybiotyku zostały ustalone przez CLSI i EUCAST dla innego gatunku bakterii.

Wyniki przedstawionych badań potwierdzają, że krajowe izolaty *B. hyodysenteriae* są wrażliwe na działanie antybiotyków powszechnie stosowanych terapii dyzenterii świń. Z względu na małą liczbę badanych szczepów, konieczne są długoterminowe badania, które mogłyby ujawnić powolne narastanie oporności dla wspomnianych pleuromutylin. W związku z powyższym monitorowanie oporności powinno być kontynuowane, w celu kontroli MIC w polskiej populacji świń.

Przeprowadzone badania pozwoliły krytycznie spojrzeć na problem antybiotykooporności krętków *Brachyspira* spp. w Polsce i umożliwiają terenowym lekarzom weterynarii zastosowanie precyzyjnych dawek leczniczych właściwie dobranych antybiotyków. Badania te pozwoliły oszacować odsetek szczepów *B. hyodysenteriae* opornych na działanie najczęściej wykorzystywanych antybiotyków stosowanych w leczeniu dyzenterii świń, w konsekwencji umożliwiając ograniczenie zużycia antybiotyków, co w istotny sposób przyczynia się do ochrony zdrowia konsumentów.

Obok antybiotykoterapii istotnym zagadnieniem w zapobieganiu infekcjom powodowanym przez *B. hyodysenteriae* jest umiejętne stosowanie immunoprofilaktyki w zwalczaniu dyzenterii świń. Nieopłacalna produkcja w przypadku dyzenterii świń związana jest z wysoką zachorowalnością, wydłużeniem okresu tuczu, większym zużyciem paszy oraz dużymi kosztami wynikającymi z długotrwałego leczenia. Nieprawidłowy dobór antybiotyku

związany jest najczęściej z nie przeprowadzeniem podstawowych badań bakteriologicznych, a w konsekwencji nie wykonaniem antybiotykoogramu wcześniej wspomnianą metodą seryjnych rozcieńczeń na podłożu płynnym. Z uwagi na obserwowane w ostatnich latach narastanie lekooporności izolatów *B. hyodysenteriae*, alternatywną i uzupełniającą metodą zapobiegania dyzenterii świń wydaje się być immunoprofilaktyka. Pomimo prowadzonych od lat badań do dzisiaj nie opracowano szczepionki, której zastosowanie dawałoby przynajmniej zadawalające efekty. Powyższe związane jest z dużym zróżnicowaniem antygenowym szczepów *B. hyodysenteriae*. Trudności związane z wyprodukowaniem skutecznej szczepionki skłaniają do oparcia immunoprofilaktyki o autoszczepionki. W związku z powyższym, celem moich badań terenowych była ocena efektów produkcyjnych w wielkotowarowej fermie świń po zastosowaniu autoszczepionki przeciw zakażeniom *B. hyodysenteriae* wyprodukowanej przez Calier Laboratories, S.A., Leon w Hiszpanii.

Doświadczenie przeprowadzono w pierwszym kwartale 2011 roku w gospodarstwie wielkotowarowym „B”, którego stado podstawowe składa się z 500 loch rasy wielkiej białej polskiej i polskiej białej zwislouchej, a roczna produkcja tuczników kształtuje się na poziomie 10 000. Zwierzęta w fermie „B” od wielu lat zakażone są *B. hyodysenteriae*. Straty między innymi z powodu tej jednostki chorobowej sięgają na porodówce 5%, warchlakarni 2,5% oraz na tuczarni 2%. Szczepieniami objęto 12 grup technologicznych loch po 44 samice w grupie. Część grup zaszczepiono – grupy doświadczalne, a pozostałe stanowiły nie szczepione grupy kontrolne. Autoszczepionkę aplikowano samicom 3-krotnie na 8, 5 i 3 tygodnie przed spodziewanym porodem. Szczepionkę stosowano również u warchlaków dwukrotnie w 5 i 8 tygodniu życia. Preparat podano łącznie 528 lochom oraz 5396 warchlakom, domięśniowo w dawce odpowiednio 4 i 2 ml. W grupach doświadczalnych i kontrolnych określono następujące parametry produkcyjne: średnia m.c. w dniu uboju (170 dzień życia), średnie dobowe przyrosty m.c., średnia liczba padnięć warchlaków i tuczników oraz współczynnik zużycia paszy na kilogram przyrostu m.c.

Wprowadzenie immunoprofilaktyki przy trwającej klinicznej postaci dyzenterii świń z wykorzystaniem autoszczepionki w stopniu istotnym ograniczyło straty spowodowane tą chorobą. Średnie dobowe przyrosty m.c. świń wahały się w poszczególnych grupach doświadczalnych w zakresie 0,574 – 0,631 kg, zaś w grupach zwierząt kontrolnych wynosiły odpowiednio 0,521 – 0,573 kg. Sumaryczny średni dobowy przyrost m.c. dla świń ze wszystkich grup doświadczalnych wynosił 0,607 kg, a dla kontrolnych 0,548 kg.

W rezultacie stosowania szczepień profilaktycznych i w związku z tym lepszymi dobowymi przyrostami m.c. wśród zwierząt doświadczalnych, uzyskano wyższą m.c. świń w

dniu ich uboju. Średnia m.c. sprzedawanych tuczników w 170 dniu życia w grupie doświadczalnej, była wyraźnie wyższa i wahała się w granicach od 97,6 do 107,31 kg, a w grupach kontrolnych od 88,68 do 97,57 kg. Efektem powyższego była średnio prawie 10 kg wyższa m.c. u zwierząt szczepionych w stosunku do świń nie poddawanych immunizacji. Analogicznie średnie dobowe przyrosty m.c. u świń szczepionych były o 59 g większe w porównaniu do zwierząt nie poddawanych szczepieniom. Odsetek padnięć warchlaków i tuczników zarówno w grupie doświadczalnej jak i kontrolnej był porównywalny i wynosił średnio dla warchlaków z grup doświadczalnych 2,1%, a dla kontrolnych 1,82%. Analogicznie w grupach tuczników doświadczalnych i kontrolnych wynosił odpowiednio 1,61 i 1,15%. W przeprowadzonym doświadczeniu stwierdzono że szczepionki oparte na szczepie homologicznym występującym w danym obiekcie gospodarskim wydają się być dobrą alternatywą do antybiotykoterapii. Zastosowanie autoszczepionki zawierającej antygen *B. hyodysenteriae* umożliwia ograniczenie strat związanych z występowaniem klinicznej formy dyzenterii świń.

Immunoprofilaktyka adenomatozy odgrywa znaczącą rolę w profilaktyce zakażeń wywołanych przez *L. intracelularis*. W związku tym kolejnym celem badań była ocena skuteczności szczepionki Enterisol Ileitis® (prod. Boehringer Ingelheim) podawanej doustnie w wodzie przeciw rozrostowemu zapaleniu. Porównawczo zastosowano dwa protokoły podczas podawania szczepionki: indywidualny *per os* lub poprzez wodę pitną dostępną dla stada. Skuteczność szczepionki badano u 3070 świń, w wieku 3–16 tygodni w ośmiu gospodarstwach trzody chlewnej. Stwierdzono, że odsetek immunizowanych świń (11.9%), które wymagały dalszego działania terapeutycznego, podczas tuczu był znacznie niższy niż obserwowany w grupie kontrolnej (28.1%) (nieleczonej). Ponadto po aplikacji szczepionki liczba wybrakowanych świń (7,4% w grupie doświadczalnej i 12,4% w grupie kontrolnej) oraz tych u których stwierdzono materiał genetyczny *L. intracelularis* została zredukowana (*L. intracelularis* w kale stwierdzono u 14,3% świń w grupie doświadczalnej i 22,5% świń w odpowiedniej grupie kontrolnej). Stwierdzono lepszą skuteczność przy indywidualnej (*per os*) aplikacji szczepionki niż poprzez podawanie biopreparatu przez system zadawania wody pitnej w gospodarstwie. Ponadto szczepienie miało pozytywny wpływ na dobowe przyrosty m.c. Ogólnie lepsze wyniki zaobserwowano w gospodarstwach o zamkniętym cyklu produkcyjnym i fermie zarodowej niż na tuczarniach.

Poniżej publikacje dotyczące tych kierunków badań:

- Kaleczyc J, Podlasz P, Winnicka A, Wasowicz W, Sienkiewicz W, **Zmudzki J**, Lakomy M. Characterization of autonomic nerve markers and lymphocyte subsets in the ileal Peyer's patch of pigs infected experimentally with *Brachyspira hyodysenteriae*. J Comp Path. 2010;143:248–57.
- Lakomy M, Winnicka A, Wasowicz K, **Zmudzki J**, Kaleczyc J, Sienkiewicz W, Podlasz P. Changes in the content of neuropeptides in intestinal lymph nodes of pigs suffering from experimental *Brachyspira hyodysenteriae* infection. Vet Med. 2009;54:315–23.
- Łakomy M, Sienkiewicz W, **Żmudzki J**, Kaleczyc J, Wąsowicz K. Changes in the expression of some neuropeptides in the intestines and nerve ganglia during the porcine dysentery. Bull Vet Inst Pulawy. 2005;49:393–98.
- Pejsak Z, Truszczyński M, **Żmudzki J**, Salwa A, Kołacz R. Field evaluation of the efficacy of vaccination against porcine proliferative enteropathy depending on the vaccination protocol and farm management system. Bull Vet Inst Pulawy. 2009;53:21–5.
- Pejsak Z, **Żmudzki J**, Stankevicius A. Rozprzestrzenienie się zakażeń *Lawsonia intracellularis* w populacji świń w Polsce. Medycyna Weter. 2001;57:887–89.
- Pejsak Z, **Żmudzki J**, Stankevicius A. Zastosowanie zmodyfikowanego testu nested – PCR w rozpoznawaniu rozrostowej enteropatii świń. Medycyna Weter. 2001;57:723–26.
- Pejsak Z, **Żmudzki J**, Wasak M, Porowski M, Wojciechowski J, Mirt D. Występowanie zakażeń *Brachyspira hyodysenteriae* i *Lawsonia intracellularis* w krajowej populacji świń. Medycyna Weter. 2007;63:994–96.
- Pidsudko Z, Kaleczyc J, **Zmudzki J**, Sienkiewicz W, Zalecki M, Klimczuk M, Wasowicz K. Changes in the tissue concentrations of several neuropeptides in porcine intestines and intestine–innervating ganglia in the course of porcine proliferative enteropathy. Vet Med. 2018;63:210–15.
- Szczotka A, Stadejek T, **Żmudzki J**, Nowak A, Osiński Z, Pejsak Z. Immunohistochemical detection of *Lawsonia intracellularis* in tissue sections from pigs. Pol J Vet Sci. 2011;14:531–38.
- Wąsowicz K, Podlasz P, Chmielewska M, Łosiewicz K, Kaleczyc J, **Żmudzki J**, Załęcki M, Pidsudko Z, Łakomy M. Changes in the expression of galanin and galanin receptors in the wall of the colon in pigs experimentally infected with *Brachyspira hyodysenteriae*. Bull Vet Inst Pulawy. 2014;58:23–8.
- **Żmudzki J**, Dors A, Wałachowski M, Pejsak Z. Przydatność immunoprofilaktyki w ograniczaniu strat świń na tle zakażeń *Brachyspira hyodysenteriae*. Życie Wet. 2012;87:130–2.

- **Żmudzki J**, Osek J, Stankevicius A, Pejsak Z. Rapid detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Lawsonia intracellularis* in swine faecal and mucosal specimens by multiplex PCR. Bull Vet Inst Pulawy. 2004;48:207–14.
- **Żmudzki J**, Stadejek T, Pejsak Z. Zastosowanie multiplex PCR w diagnostyce różnicowej wybranych enteropatii krwotocznych świń. Medycyna Weter. 2006;62:1420–23.
- **Żmudzki J**, Szczotka A, Nowak A, Strzelecka H, Grzesiak A, Pejsak Z. Antimicrobial susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* isolated from 21 Polish farms. Pol J Vet Sci. 2012;15:259–265.
- **Żmudzki J**, Szczotka A, Podgórska K, Nowak A, Grzesiak A, Dors A, Pejsak Z. Application of real-time PCR for detection of *Lawsonia intracellularis* and *Brachyspira hyodysenteriae* in fecal samples from pigs. Pol J Vet Sci. 2012;15:267–73.
- **Żmudzki J**, Szczotka A. Rozrostowe zapalenie jelit – obraz choroby i strategia postępowania. Magazyn Wet. 2008;132:205–8.

oraz zaprezentowane w formie doniesień na konferencje międzynarodowe:

- Pejsak Z, Kołodziejczyk P, **Żmudzki J**, Stankiewicz I, Kozanecki P, Szrom A. Efficacy and safety of Econor (Valnemulin hydrochloride) in pigs affected by swine dysentery. Proc. 17th Cogress of the International Pig Veterinary Society, Iowa State University Ames, Iowa USA, June 2-5, 2002, 2, p. 185.
- Pejsak Z, **Żmudzki J**, Porowski M, Stankiewicz I, Skrzek M, Wasak M. *Lawsonia intracellularis* and *Brachyspira hyodysenteriae* species prevalence in fatteners in Czech Republic, Hungary and Poland (Polish farrow – to finish farms with diarrhea). Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark 16-19.07.2006, Vol. 2, p. 177.
- Pejsak Z, **Żmudzki J**, Salwa A, Nowak A, Wojciechowski J. Efficacy of oral vaccination against porcine proliferative enteropathy on farms endemically infected with PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae*. Proceedings of the 20th IPVS Congress, Durban, South Africa, 22-26 June 2008, P03.067, p. 286.
- Pejsak Z, **Żmudzki J**, Salwa A, Nowak A, Wojciechowski J. Field efficacy of attenuated *Lawsonia intracellularis* vaccine for control of ileitis in mid- and large size farms in Poland. Proceedings of the 20th IPVS Congress, Durban, South Africa, 22-26 June 2008, P03.068, p. 287.
- Pejsak Z, **Żmudzki J**, Stankevicius A. Application of one tube nested-polymerase chain reaction for diagnosis of proliferative enteropathy in pigs. X International Symposium of

Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE Seminar on Biotechnology, Salsomaggiore – Parma, Italy, 4-7 July 2001, p. 176–7.

- Pejsak Z, **Żmudzki J**. Efficacy of oral vaccination against PPE on farms endemically infected with PRRSV and M. hyo. PIG PROGRESS IPVS Focus 2008. 20th IPVS Congress, Durban 2008, p. 18.
- Szczotka A, **Żmudzki J**, Pejsak Z, Stadejek T. Presence of porcine circovirus type 2, *Lawsonia intracellularis* and *Brachyspira hyodysenteriae* in pigs with diarrhoea. Proceedings of the 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada, July 18-21, 2010, p. 465.
- Szczotka A, **Żmudzki J**, Pejsak Z, Stadejek T. Identification of porcine circovirus type 2, *Lawsonia intracellularis* and *Brachyspira hyodysenteriae* in pigs with diarrhoea. Proc. 1st ESPHM, Copenhagen, Denmark, 27-28.08.2009, p. 70.
- **Żmudzki J**, Stankevicius A, Pejsak Z. Detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Lawsonia intracellularis* in faeces and mucosal specimens by multiplex polymerase chain reaction. Proceedings of the 18th IPVS Congress, Hamburg, Germany, 27.06-01.07. 2004, p. 299.
- **Żmudzki J**, Szczotka A, Stadejek T, Pejsak Z. Differential diagnosis of swine dysentery and proliferative enteropathy by multiplex PCR. Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark 16-19.07.2006, Vol. 2, p. 344.
- **Żmudzki J**, Wojciechowski J, Pejsak Z. The prevalence of *Lawsonia intracellularis* and *Brachyspira hyodysenteriae* in Polish swine herds. Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark 16-19.07.2006, Vol. 2, p. 345.

***Staphylococcus aureus* (MRSA) – zagrożenia, występowanie oraz charakterystyka fenotypowa i genotypowa**

W kolejnym etapie mojej działalności naukowej zainicjowałem w Zakładzie Chorób Świń badania dotyczące innych zoonoz obejmujące zagadnienia związane z metycyloopornymi szczepami gronkowca złocistego (*ang.* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* – MRSA) jako potencjalnego zagrożenia dla lekarzy weterynarii i hodowców trzody chlewnej. Badania te wykonywałem jako kierownik projektu w ramach grantu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki pt.: Populacja *Staphylococcus aureus* opornych na metycylinę (MRSA) występujących u trzody chlewnej i hodowców w Polsce – charakterystyka fenotypowa i genotypowa. Projekt ten realizowany był z Narodowym Instytutem Leków w Warszawie we współpracy z zespołem Pani Prof. dr hab. Walerii Hryniewicz i Panią dr Joanną Empel.

Powiązany ze zwierzętami *S. aureus* (*ang.* livestock – associated *Staphylococcus aureus* – LA-SA) jest coraz częściej dostrzegalny, ze względu na szczególną zdolność do kolonizacji zwierząt gospodarskich a następnie bezpośredniej transmisji na człowieka, co z kolei prowadzi do rozprzestrzeniania się drobnoustroju w środowisku. Ponadto gronkowiec złocisty, jest jednym z głównych bakteryjnych czynników etiologicznych zakażeń, zarówno szpitalnych, jak i poza szpitalnych. Szczególnie groźne są szczepy *S. aureus* odporne na metycylinę, które z definicji są odporne na wszystkie antybiotyki beta-laktamowe, a ponadto, często wykazują oporność na wiele innych leków przeciwbakteryjnych. Szczepy MRSA występują przede wszystkim w szpitalach (*ang.* hospital-acquired – HA-MRSA), chociaż coraz częściej izolowane są w środowiskach poza szpitalnych, tzw. szczepy CA-MRSA. W 2004 roku opisano po raz pierwszy nowe szczepy MRSA, tzw. FA-MRSA (*ang.* farm-associated – MRSA). Szczepy te szybko rozprzestrzeniły się w środowiskach związanych z hodowlą trzody chlewnej w wielu krajach na świecie. Wszystkie analizowane do tej pory FA-MRSA należą do nowego kompleksu klonalnego CC398, ze zdecydowanie dominującym szczepem ST398. W Polsce od lat prowadzone są w obszarze nauk medycznych badania dotyczące zakażeń wywoływanych przez szczepy *S. aureus*, a w szczególności, epidemiologii szczepów opornych na metycylinę, zarówno HA-MRSA jak i CA-MRSA. Nie były natomiast podejmowane, na większą skalę, badania dotyczące epidemiologii FA-MRSA. Ze względu na pojawienie się na świecie nosicielstwa szczepów *S. aureus* ST398, zarówno MRSA jak i *S. aureus* metycylo-wrażliwych MSSA (*ang.* methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*), oraz pierwszych zakażeń wywołanych przez MRSA ST398 w populacji trzody chlewnej, problem ten stał się również istotny w dziedzinie nauk weterynaryjnych.

Celem pracy była ocena rozprzestrzeniania się LA-SA wśród gospodarstw trzody chlewnej wyselekcjonowanych w całej Polsce, charakterystyki struktury populacyjnej zidentyfikowanego *S. aureus* oraz ocena nosicielstwa LA-SA wśród rolników i lekarzy weterynarii mających kontakt z trzodą chlewną.

Badanie przeprowadzono na 123 gospodarstwach trzody chlewnej (89 w cyklu zamkniętym i 34 stada zarodowe), zlokalizowanych w 15 na 16 województw w Polsce. Analizie poddano wymazy z nosa od świń, a także próbki kurzu. *S. aureus* wykryto w 79 (64,2%) gospodarstwach pochodzących z 14 województw. Wśród badanych ferm dominowały gospodarstwa z pozytywnym wynikiem dla LA-SA (71/79, 89,9%, 95% CI [81,0%, 95,5%]). Odsetek gospodarstw LA-MRSA dodatnich był niższy w stosunku do ferm LA-MSSA-pozytywnych (36,6% ferm LA-SA dodatnich, 95% CI [25,5%, 48,9%] vs. 74,6%, 95% CI [62,9% 84,2%]). W sumie zidentyfikowano 190 izolatów *S. aureus*: 72 (38%) MRSA i 118 (62%) MSSA, z których 174 (92%) izolaty zostały zakwalifikowane do trzech linii klonalnych LA-SA: CC398 (73%), CC9 (13%) i CC30 / ST433 (6%). Wszystkie izolaty CC398 należały do klonów pochodzących od zwierząt. Wykryto cztery klony LA-MRSA: Klon ST433-IVa (2B) (n = 8, 11%), według najlepszej wiedzy opisany po raz pierwszy oraz trzy klony ST398 (n = 64, 89%) z najbardziej rozpowszechnionym ST398-V (5C2&5)c, a następnie ST398-V (5C2) i ST398-IVa (2B). Nosicielstwo LA-SA przez hodowców trzody chlewnej oszacowano na poziomie 13,2% (38/283), dla CC398 wynosiło 12,7% (36/283), oraz dla ST398-MRSA 3,2% (9/283), podczas gdy wartości te u lekarzy weterynarii kształtowały się odpowiednio na poziomie: 21,1% (8/38), 18,4% (7/38) i 10,5% (4/38).

Liczebność gospodarstw trzody chlewnej LA-MRSA dodatnich w Polsce znacznie wzrosła od 2008 roku, odkąd przeprowadzono pierwsze podstawowe badanie w kierunku MRSA w Europie. W przeważającej części gospodarstw trzody chlewnej w Polsce dominuje klon CC398, co jest dowodem na nosicielstwo MRSA wśród lekarzy weterynarii i hodowców świń. Jednak znalezienie nowego klonu ST433-IVa (2B) stanowi dowód na trwającą ewolucję LA-MRSA i argumentuje za dalszym monitorowaniem *S. aureus* u zwierząt gospodarskich. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń zostały szczegółowo opisane w następujących publikacjach zagranicznych:

- Mroczkowska A, **Żmudzki J**, Marszałek N, Orczykowska-Kotyła M, Komorowska I, Nowak A, Grzesiak A, Czyżewska-Dors E, Dors A, Pejsak Z, Hryniewicz W, Wyszomirski T, Empel J. Livestock-associated *Staphylococcus aureus* on Polish pig

farms. PLoS One. 2017;12: e0170745. doi: 10.1371/journal.pone.0170745. eCollection 2017.

- Price LB, Stegger M, Hasman H, Aziz M, Larsen J, Andersen PSI, Battisti A, Franco A, **Zmudzki J**, Schwarz S, Butaye P, Jouy E, Pomba C, Porrero MC, Ruimy R, Smith TC, Robinson DA, Weese JS, Arriola CS, Yu F, Laurent F, Keim P, Skov R, Aarestrup FM. *Staphylococcus aureus* CC398: host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock. MBio. 2012 Feb 21;3(1). Erratum in MBio. 2013;4(1):doi/10.1128/mBio.00520-12 (zgłoszony do WoS błąd w nazwisku).

oraz zaprezentowane w formie doniesień na konferencje krajowe i międzynarodowe:

- Grzesiak A, **Żmudzki J**, Nowak A. Metycylinooporne szczepy *Staphylococcus aureus* – potencjalne zagrożenie dla lekarzy weterynarii i hodowców trzody chlewnej. Choroby Świń. W monografii ”Konkurencyjny chów zdrowych prosiąt i tuczników – wyzwanie dla hodowców i lekarzy weterynarii”. Puławy, 15-16.06. Magazyn Wet. 2010:648–650.
- Marszałek N, Empel J, **Żmudzki J**, Nowak A, Pejsak Z, Hryniewicz W. First methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of ST398 isolated in Poland from nasal carriers. 19th European Congress of Clin. Microbiol. and Inf. Dis., Helsinki, Finland, 16-19 May 2009.
- Mroczkowska M, Orczykowska-Kotyła N, Marszałek I, Komorowska A, Grzesiak A, Nowak A, **Żmudzki J**, Empel J. Molecular characterization of *S. aureus* associated with pig environment in Poland, 2010-2013. 3rd ASM-ESCMID CONFERENCE on Methicillin-resistant Staphylococci in Animals: Veterinary and Public Health Implications, 4-7.11.2013, Copenhagen, Denmark, poster nr 16A p. 48.
- **Żmudzki J**, Empel J, Marszałek N, Nowak A, Hryniewicz W, Pejsak Z. Occurrence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in nasal Swabs from Polish veterinarians. 3rd Annual Meeting EPIZONE “Crossing borders”, 12-15 May 2009, Antalya, Turkey, p. 165.

Inna tematyka badawcza

Wybrane doświadczenia terenowe z udziałem zwierząt gospodarskich (trzoda chlewna)

Brałem aktywny udział w badaniach doświadczalnych prowadzonych w wielkotowarowej fermie trzody chlewnej dotyczących zastosowania antybiotykowych preparatów o skojarzonym działaniu w profilaktyce biegunek w okresie około odsadzeniowym. Zakażenia patogennymi szczepami *Escherichia coli* (*E. coli*) u prosiąt w okresie po odsadzeniu ich od macior, mogą być przyczyną biegunek, prowadzących do odwodnienia, zaburzeń równowagi kwasowo–zasadowej, zmniejszenia przyrostów m.c. oraz w konsekwencji do padnięć. Najczęstszą przyczyną zaburzeń jelitowych u prosiąt odsadzanych są enterotoksyczne szczepy *E. coli* (ETEC).

Czynnikami chorobotwórczości enteropatogennych szczepów *E. coli* są fimbrie adhezyjne odpowiedzialne bezpośrednio za kolonizację nabłonka jelitowego przez bakterie, oraz enterotoksyny. Najczęstszym czynnikiem kolonizacyjnym szczepów ETEC są u prosiąt w okresie po odsadzeniowym fimbrie F18, obecności których nie stwierdza się u prosiąt osesków. Nie są one jednak bezpośrednią przyczyną biegunek. Za proces ten odpowiedzialne są wcześniej wspomniane, uwalniane przez patogenne szczepy *E. coli* czynniki toksyczne zwane enterotoksynami (werotoksyna, Stx2e). W rozwoju kolibakterioz okresu odsadzeniowego istotną rolę odgrywa nieodpowiednie karmienie prosiąt przede wszystkim wysokobiałkowymi mieszankami pasz treściwych oraz nagła zmiana ich rodzaju. W zwalczaniu tej postaci kolibakteriozy immunoprofilaktyka nie znalazła jak dotychczas zastosowania z powodu braku skutecznej szczepionki. Dlatego też zwalczanie kolibakterioz okresu około odsadzeniowego oparte jest na stosowaniu odpowiednich dla tego okresu życia prosiąt pasz, zakwaszaczy oraz chemioprofilaktyce.

Jednym z preparatów mogących znaleźć zastosowanie w programach profilaktycznych jest Linco–Spectin®, w którego skład wchodzi **spektynomycyna** i **linkomycyna**. Pierwsza z wymienionych substancji zaliczana jest do grupy preparatów aminoglikozydowych, natomiast druga należy do linkosamidów nazwanych niekiedy monoglikozydami.

Celem badań było określenie przydatności preparatu Linco–Spectin® 44 Premix w kontroli i ograniczaniu strat związanych z kolibakteriozą prosiąt okresu około odsadzeniowego. Linco–Spectin® 44 Premix. Badania mające na celu ocenę kliniczną skuteczności w/w preparatu przeprowadzono w gospodarstwie wielkotowarowym o zamkniętym cyklu produkcji w którym roczna produkcja tuczników kształtuje się na poziomie 15000. Do badań użyto łącznie 13618 świń, które podzielono na 2 grupy. Grupę doświadczalną stanowiły prosięta z 16 grup technologicznych, w sumie 6558 prosiąt. Grupę kontrolną tworzyła taka sama liczba grup

technologicznych, łącznie 7060 prosiąt. Zwierzęta w grupach doświadczalnych otrzymywały przez 14 po odsadzeniu Linco–Spectin® 44 Premix w ilości 2 kg/tonę paszy. W grupach zwierząt kontrolnych stosowano Trimerazin (Sulfamerazyna; Trimetoprim). Parametry produkcyjne w każdej grupie doświadczalnej porównywano z grupami kontrolnymi w celu stwierdzenia efektywności stosowanej antybiotykoterapii. Efektywność postępowania oceniano na podstawie średnich przyrostów m.c. od odsadzenia do 70 dnia życia, liczby prosiąt padłych oraz średnich dobowych przyrostów m.c. w tym okresie. Objawy biegunki oraz zahamowania przyrostów m.c. obserwowano u prosiąt zazwyczaj w 4 dniu po odsadzeniu, natomiast w 5, 6 i 7 dniu notowano wyraźnie zwiększone padnięcia we wszystkich grupach odsadzanych prosiąt. Badaniem sekcyjnym stwierdzono niewielkie przekrwienie, zwiotczenie jelit cienkich oraz obrzęk żołądka i krezki jelit. Rezultaty badań wykazały, że m.c. świń doświadczalnych przy pomiarze w 70 dniu życia wynosiła 21,02 kg i była około 2 kg wyższa niż świń kontrolnych (19,10 kg). Liczba padnięć wśród świń z grupy doświadczalnej (2,10%) była prawie o połowę mniejsza niż w grupach kontrolnych (4,39%). Badaniem bakteriologicznym z wycinków jelit cienkich wykazano wzrost drobnoustrojów z gatunku *E. coli*. Testem antybiotykowrażliwości na podłożu Mueller–Hinton stwierdzono, że wszystkie wyizolowane szczepy bakteryjne są wrażliwe na działanie spektynomycyny i linkomycyny. Testem multiplex PCR potwierdzono obecność fimbrii F18 odpowiedzialnych za kolonizację nabłonka jelitowego. Badania wykazały wysoką skuteczność mieszaniny linkomycyny i spektynomycyny podawanej do paszy 2 tygodnie po odsadzeniu, wyrażającą się zwiększonymi średnimi przyrostami m.c., zmniejszoną liczbą padnięć oraz zahamowaniem biegunek wywołanych przez enteropatogenne szczepy *E. coli*.

Brałem również udział w doświadczeniu terenowym dotyczącym oceny skuteczności **doksycykliny** w terapii mieszanych zakażeń układu oddechowego świń. Choroby układu oddechowego świń, z uwagi na ich wieloczynnikowy charakter, stanowią poważny problem w produkcji trzody chlewnej. Spośród czynników zakaźnych istotną rolę odgrywają, między innymi: *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*) oraz wirus zespołu rozrodzo–odechowego świń (PRRSV) oraz okresowo kolonizujące układ oddechowy, powodujące wtórne infekcje bakteryjne drobnoustroje z gatunku: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Streptococcus* spp., *Haemophilus* spp., *Staphylococcus* spp., *Salmonella* spp., czy *E. coli*. Celem badań była ocena skuteczności doksycykliny, podstawowego składnika preparatu Doxymina® 20% (prod. Drwalewskie Zakłady Przemysłu Bioweterynaryjnego S.A.) w chemioprophylaktyce mieszanych zakażeń układu oddechowego świń w warunkach terenowych. Badania przeprowadzono w dwóch fermach

wielkotowarowych „S” i „W”. Nieszkodliwość preparatu oceniano w chlewni „K”. Do badań klinicznych użyto łącznie 635 prosiąt. W chlewni „S” wykorzystano 340 prosiąt, natomiast w obiekcie „W” 295. Zwierzętom doświadczalnym podawano przez 7 dni po odsadzeniu (28 dzień życia) Doxyminę® 20% w wodzie do picia, w dawce 10mg/kg m.c. Równocześnie zwierzętom z grup kontrolnych dodatnich podawano Ronaxan® 20% (Merial) w gospodarstwie „S” i Biomox® (Biowet S.A.) – 8,7g amoksycyliny w 100g preparatu w fermie „W” w dawkach zalecanych przez producenta. W obu obiektach świniom z grupach kontrolnych ujemnych nie podawano żadnego leku, natomiast w przypadku stwierdzenia pierwszych objawów chorobowych stosowano u nich zgodnie z zaleceniami producenta amoksycylinę (Synulox®). Dla określenia efektywności Doxyminy® 20% ocenie poddano: wskaźnik zachorowań z objawami ze strony układu oddechowego, liczbę interwencji lekarskich w grupie oraz w przeliczeniu na jednego na jednego osobnika, wskaźnik padnięć oraz przyrosty m.c. Wszystkie parametry dotyczyły okresu od odsadzenia do 60 dni po odsadzeniu. Współczynnik padnięć w grupie doświadczalnej w gospodarstwie „W” wynosił 5,38%. Parametr ten był znacznie niższy w grupie kontrolnej ujemnej (8,57%) i był porównywalny z grupą kontrolną dodatnią. W gospodarstwie „S” parametr ten wynosił w grupie kontrolnej 5,83%, 9% w grupie kontrolnej ujemnej i 5% w grupie kontrolnej dodatniej. Wyniki wykazały, że Doxymina® 20% miała znaczący wpływ na przyrost m.c. Średnie przyrosty m.c. świń były porównywalne w ostatnim dniu obserwacji ze średnią m.c. zwierząt z kontroli dodatniej i znacznie wyższe niż w grupach kontrolnych ujemnych. Pozostałe parametry były podobne. W wyniku przeprowadzonych badań terenowych stwierdzono, że Doxymina® 20% stosowana w dawkach zalecanych przez producent cechowała się znaczną skutecznością w terapii mieszanych zakażeń układu oddechowego świń.

Ponadto uczestniczyłem w pracach związanych z oceną przydatności immunoprofilaktyki w ograniczaniu strat świń na tle zakażeń *Streptococcus suis* typ 2. Alfa i beta hemolityczne paciorkowce należące do typu 2 – grupa D, podgrupa R mogą być przyczyną takich objawów klinicznych jak zapalenie: opon mózgowych, płuc, stawów, wsierdza, błon surowiczych, a niekiedy nawet poronień. Celem badań terenowych była ocena możliwości immunoprofilaktyki streptokokozji świń prowadzonej z użyciem autoszczepionki przeciw infekcjom *Streptococcus suis* typ 2, produkowanej przez Państwowy Instytut Weterynaryjny w Puławach. Doświadczenie przeprowadzono w gospodarstwie wielkotowarowym „S”, którego stado podstawowe liczyło 1400 loch, a roczna produkcja tuczników kształtowała się na poziomie 30 000. Objawy kliniczne choroby ujawniały się zazwyczaj 7 dni po porodzie, lecz poważne problemy pojawiały się u 6–7 tygodniowych warchlaków, u których stwierdzano

objawy nerwowe ze strony centralnego układu nerwowego. Starty w gospodarstwie z powodu streptokokozy wynosiły niemal 5%. Szczepionkę stosowano u prosiąt tuż przed odsadzeniem (24 dzień życia) oraz 2 tygodnie później (38 dzień życia). Preparat aplikowano dwukrotnie domięśniowo w dawce 2 ml. Jedna dawka szczepionki zawierała co najmniej $2-5 \times 10^9$ inaktywowanych komórek *Streptococcus suis* (*Strep. suis*). Biopreparat zastosowano w 6 grupach technologicznych liczących po około 360 zwierząt (łącznie 2168). Pozostałe 2 grupy (łącznie 727 świń) tworzyły kontrolę. W doświadczeniu określono następujące parametry: średnią m.c. w dniu odsadzenia, liczbę zachorowań z objawami streptokokozy, liczbę prosiąt padłych w okresie obserwacji oraz średnią m.c. w dniu przemieszczania zwierząt na tuczarnię. Analizowane wyniki wskazują na znaczne ograniczenie średniej liczby świń z typowymi objawami ze strony centralnego układu nerwowego (5,62% w grupach eksperymentalnych i 9,62% w grupie kontrolnej). Podobnie zaobserwowano niższą śmiertelność u zaszczepionych świń. Średnia wskaźnik padnięć dla grupy kontrolnej wynosił 4,67%, a dla grup doświadczalnych wynosił 2,30%. Średnie dobowe przyrosty m.c. były o ponad 1,00 kg wyższe w porównaniu z grupami kontrolnymi nie otrzymującymi biopreparatu. Zastosowanie autoszczepionki zawierającej antygen *Strep. suis* oraz adiuwanty olejowy i wodorotlenek glinu umożliwia wyraźne ograniczenie strat związanych z występowaniem mózgowo- oponowej postaci streptokokozy świń.

Brałem udział w pracy opisującej ostry przypadek choroby Glässera w wielkotowarowej fermie świń. Choroba ta określana również jako zakaźne zapalenie błon surowiczych i stawów (*poliserositis*). Ze względu na brak piśmiennictwa krajowym danych na temat w/w jednostki chorobowej uznano za celowe przedstawienie wyników badań klinicznych, anatomopatologicznych i bakteriologicznych przeprowadzonych w jednej z ferm dotkniętych tą chorobą. Szczegółowe badania przeprowadzono w drugim i trzecim kwartale 2001 roku w gospodarstwie wielkotowarowym „S”, którego stado podstawowe tworzyło 1800 loch, a roczna produkcja prosiąt kształtowała się na poziomie 50 000. Przeprowadzony wywiad wskazywał, że zachorowania z objawami wskazującymi na chorobę Glässera stwierdzano średnio u 25% prosiąt odsadzonych od macior w wieku 24 dni. Głównymi objawami klinicznymi u większości chorych zwierząt były: wzrost w.c.c. od 40,5°C do 41,5°C, bledność powłok, silna duszność, krótkotrwały kaszel, obrzęk stawów, zapalenie spojówek, nieżytywy wypływ z nosa oraz kulawizny, które stwierdzano u 1/3 chorych świń. Typowym symptomem było szybkie chudnięcie większości chorych zwierząt. Szczyt padnięć przypadał na 48 godzin po wystąpieniu pierwszych objawów chorobowych. W pierwszych 2 miesiącach trwania choroby padło 398 warchlaków. Szczegółowym badaniom anatomopatologicznym poddano 55

warchlaków padłych nagle lub z typowymi klinicznymi objawami choroby Glässera. U wszystkich padłych zwierząt stwierdzono: surowiczo–włóknikowe zapalenie osierdzia, otrzewnej, opłucnej, wyraźne powiększone i przekrwione węzłów chłonnych pachwinowych oraz śródmiąższowe zapalenie płuc (u 70% świń). Ponadto stwierdzono zmiany zapalne w stawach po przecięciu torebki stawowej, zwiększoną ilość zapalnego płynu wysiękowego w jamie klatki piersiowej i brzusznej oraz włóknikowe zapalenie opon mózgowych. Badaniem bakteriologicznym stwierdzono obfity wzrost drobnoustrojów z gatunku *Haemophilus parasuis* (*H. parasuis*), natomiast badaniami serologicznymi testem ELISA potwierdzono obecność przeciwciał dla PRRSV i *M. hyopneumoniae*. Podsumowując, był to pierwszy ostry przypadek zakażenia *H. parasuis* w Polsce, będący przyczyną znacznych strat ekonomicznych w produkcji trzody chlewnej. W populacji świń zakażonych PRRSV i *M. hyopneumoniae* dominującym objawem infekcji wywołanej przez *H. parasuis* mogą być objawy zapalenia płuc.

Brałem udział w badaniach terenowych opisujących masowe zatrucia tlenkiem węgla będącego przyczyną masowych ronień loch. Jednym z najczęstszych zatruc gazowymi związkami chemicznymi jest wspomniany **tlenek węgla (CO)**. Po raz pierwszy w Polsce opisano przypadek masowych ronień loch na tle zatrucia CO. Do zatrucia CO doszło w gospodarstwie wielkotowarowym „C”, którego stado podstawowe tworzy 1100 loch, a roczna produkcja tuczników kształtuje się na poziomie 25000. Na początku stycznia 2006 r. ostre, niespecyficzne objawy zatrucia CO u macior zostały błędnie zdiagnozowane przez lekarzy weterynarii. W 8 sektorach porodowych zaobserwowano tylko 2 poronienia (79 macior). Objawy kliniczne obejmowały: niedowład, wymioty, drażliwość, a nawet agresję. Prosięta, które urodziły się żywe, były niespokojne, wykazywały słaby odruch ssania i nie reagowały na zewnętrzne bodźce. Wykonano badania laboratoryjne w celu wykluczenia infekcji wirusowych i bakteryjnych oraz przeprowadzono analizy chemiczne ukierunkowane na: zatrucia, oznaczenie zearalenonu, toksycznych metali, kumaryny i rodentycydów w paszy i nerkach. Wszystkie analizy laboratoryjne były ujemne. W trakcie przeprowadzonej sekcji poronionych płodów lub martwo urodzonych prosiąt stwierdzono następujące zmiany anatomopatologiczne: wiśniowo czerwone odbarwienia tkanki podskórnej, mięśni, wnętrza jamy brzusznej i klatki piersiowej. Zaobserwowano również zasinienie i opuchliznę moszny (wewnątrz galaretowaty wysięk) oraz zasinienie podbrzusza. Dodatkowo stwierdzono zasinienie skóry głowy. Tkanka skórna na głowie była miękka i popękana. Ponadto w worku osierdziowym oraz w jamie opłucnowej i otrzewnowej stwierdzono znaczne ilości krwistego płynu wysiękowego. Po zakończeniu wywiadu właściciel fermy ujawnił, że w okresie jesiennym zdecydował się na wymianę ogrzewania elektrycznego na gazowe instalując w każdym kojcu porodowym lampy

gazowe typu „kwoka”. Dodatkowo w budynkach tych wymieniono nieszczelne stare okna drewniane na szczelne plastikowe. Ten fakt oraz przede wszystkim objawy kliniczne i zmiany sekcyjne, a także ujemne wyniki przeprowadzonych badań laboratoryjnych wskazały, że przyczyną poronień był CO. Podejrzanie zostało w sposób pośredni potwierdzone tym, że po wyłączeniu lamp gazowych i ponownym zainstalowaniu ogrzewania elektrycznego problem poronień został rozwiązany. Intensywnie eksploatowane lampy gazowe w okresie zimowym były nieprawidłowo wyregulowane i użytkowane. To prawdopodobnie przyczyniło się do niecałkowitego spalania gazu, co w konsekwencji spowodowało produkcję CO. Na poparcie prawidłowo postawionej diagnozy był fakt, że poronienia ustały natychmiast po wyłączeniu grzejników wykorzystujących gaz. Poniżej lista wybranych publikacji związanych z opisanymi doświadczeniami przeprowadzonymi w wielkotowarowych fermach trzody chlewnej.

- Pejsak Z, Wojciechowski J, Porowski M, Wałachowski M, **Żmudzki J**. Efektywność szczepionki Streptovac w zwalczaniu streptokokozy świń. *Medycyna Weter.* 2008;64:113–16.
- Pejsak Z, **Żmudzki J**, Bogusz R. Przydatność immunoprofilaktyki w ograniczaniu strat świń na tle zakażeń *Streptococcus suis* typ 2. *Medycyna Weter.* 2001;57:251–4.
- Pejsak Z, **Żmudzki J**, Wałachowski M. Ostry przypadek choroby Glässera w wielkotowarowej fermie świń. *Medycyna Weter.* 2002;58:192–6.
- Pejsak Z, **Żmudzki J**, Wojnicki P. Abortion in sows associated with carbon monoxide intoxication. *Vet Rec.* 2008;162:417–18.
- Pejsak Z, **Żmudzki J**, Wojnicki P. Tlenek węgla jako przyczyna masowych ronień loch. *Medycyna Weter.* 2007;63:595–97.
- **Żmudzki J**, Kamyczek M, Kwaczyński R. Stosowanie spektomycyny i linkomycyny w profilaktyce kolibakteriozy prosiąt. *Medycyna Weter.* 2002;58:285–7.
- **Żmudzki J**, Szczotka A, Jabłoński A, Porowski M. Skuteczność doksycykliny w terapii mieszanych zakażeń układu oddechowego świń. *Medycyna Weter.* 2004;60:743–6.

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)

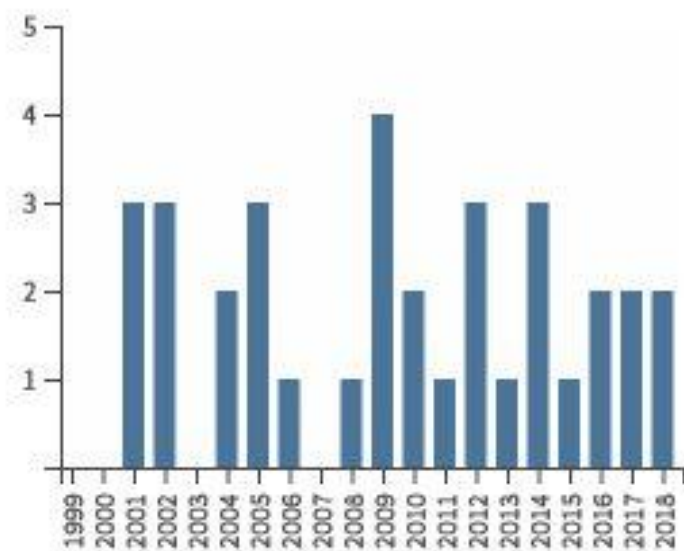
Zestawienie publikacji naukowych:

Liczba publikacji w czasopismach z listy JCR	37
- w tym: opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora	26
- w tym: stanowiących osiągnięcie habilitacyjne	4
Liczba publikacji w czasopismach spoza listy JCR oraz autorstwa w monografiach	16
- w tym: stanowiących osiągnięcie habilitacyjne	1
Całkowita liczba publikacji	53
Liczba komunikatów konferencyjnych	31
Sumaryczny współczynnik wpływu (Impact Factor, IF)	25,696
- w tym dla publikacji po uzyskaniu stopnia doktora	22,95
- w tym dla publikacji stanowiących osiągnięcie habilitacyjne	3,567
Suma punktów MNiSW	661
- w tym: dla publikacji po uzyskaniu stopnia doktora	550
- w tym: dla publikacji stanowiących osiągnięcie habilitacyjne	91
Liczba cytowań wg. Web of Science Core Collection	355
- w tym: bez autocytowań	343
Indeks Hirscha wg. Web of Science Core Collection	6

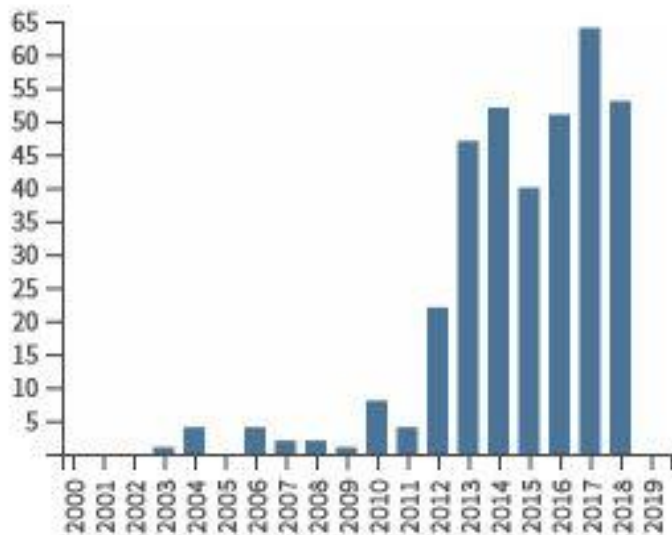
Zestawienie liczby publikacji w poszczególnych czasopismach z listy JCR

Czasopismo	Liczba publikacji (w tym jako pierwszy autor)
Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy /Journal of Veterinary Research	9 (2)
Medycyna Weterynaryjna	16 (5)
Veterinary Record	1
Journal of Comparative Pathology	2
Acta Veterinaria Scandinavica	2 (2)
MBio	1
Polish Journal of Veterinary Sciences	3 (2)
PLos One	1
Veterinari Medicina	2
Liczba publikacji razem (w tym jako pierwszy autor)	37 (11)

Liczba publikacji w poszczególnych latach
(wg. Web of Science - Core Collection, z dnia 2018.10.29)



Liczba cytowań w poszczególnych latach
(wg. Web of Science - Core Collection, z dnia 2018.10.29)



Puławy, 2018.11.04

Janek Zmuda