

Załącznik nr 2 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

Zbigniew Józef Arent

Uniwersyteckie Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR

Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja

W Krakowie

AUTOREFERAT

Kraków 2018

1. Imię i nazwisko

Zbigniew Józef Arent

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

2000 – **doktor nauk weterynaryjnych**

Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie;

Tytuł rozprawy doktorskiej: "Zakażenia *Brucella ovis* w świetle badań immunochemicznych i serologicznych"

promotor: prof. dr hab. Jerzy Wiśniewski; recenzenci: prof. dr hab. Maria Nikolańczuk oraz dr hab. Grażyna Gęsicka-Grabowska, prof. UWM.

1993 – **lekarz weterynarii**

Wydział Weterynaryjny, Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie;

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych

2016 – obecnie: **Kierownik Ośrodka Medycyny Eksperymentalnej i Innowacyjnej**,
Uniwersyteckie Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR,
Uniwersytet Rolniczy im Hugona Kołłątaja w Krakowie

2016-obecnie: **Adiunkt naukowo-dydaktyczny**, Uniwersyteckie Centrum Medycyny
Weterynaryjnej UJ-UR, Uniwersytet Rolniczy im Hugona Kołłątaja w
Krakowie

2007-2015: **Senior Scientific Officer**, OIE Leptospirosis Reference Laboratory,
Veterinary Sciences Division, Agri-Food & Biosciences Institute, Belfast,
UK.

1994-2007: **Kierownik Pracowni**, Zakład Higieny Weterynaryjnej, Wojewódzki
Inspektorat Weterynarii w Gdańsku

1993-1994: **Asystent** w Zakładzie Higieny Weterynaryjnej, Wojewódzki Inspektorat
Weterynarii w Gdańsku

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. Dz.U. z 2016 r. poz.1311)

a) osiągnięciem naukowym jest jednotematyczny cykl publikacji pod wspólnym tytułem:

"Wybrane aspekty epidemiologiczne w zakażeniach *Leptospira* spp. u zwierząt"

b) publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe:

Z-1: Arent Z., Kedzierska-Mieszkowska S.: Seroprevalence study of leptospirosis in horses in northern Poland. *Veterinary Record* 2013, 172(10).

IF₂₀₁₂= 1.633; MNiSW₂₀₁₂= 35pkt.; liczba cytowań= 13

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części badań laboratoryjnych, opracowaniu wyników i przygotowaniu pracy do druku (autor korespondencyjny). Mój udział procentowy szacuję na 90%.

Z-2: Arent Z., Gilmore C., Brem S., Ellis W.A.: Molecular studies on European equine isolates of *Leptospira interrogans* serovars Bratislava and Muenchen Horses. *Infection Genetics and Evolution* 2015, 34, 26-31.

IF₂₀₁₅=2,591; MNiSW₂₀₁₅= 30 pkt.; liczba cytowań= 7

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części badań laboratoryjnych, opracowaniu wyników i przygotowaniu pracy do druku (autor korespondencyjny). Mój udział procentowy szacuję na 80%.

Z-3: Arent Z., Frizzell C., Gilmore C., Allen A., Ellis W.A.: *Leptospira interrogans* serovars Bratislava and Muenchen animal infections: Implications for epidemiology and control. *Veterinary Microbiology* 2016, 190, 19-26.

IF₂₀₁₆=2,628; MNiSW₂₀₁₆= 35 pkt.; liczba cytowań= 5

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części badań laboratoryjnych, opracowaniu wyników i przygotowaniu pracy do druku (autor korespondencyjny). Mój udział procentowy szacuję na 80%.

Z-4: Arent Z., Gilmore C., Barlow A.M., Smith L., Ellis W.A.: *Leptospira interrogans* serogroup Pomona infections in the United Kingdom: is there a real threat for farm animals? *Veterinary Record* 2017, 180, 424+.

IF₂₀₁₆=1,737; MNiSW₂₀₁₆= 35 pkt.; liczba cytowań= 2

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części badań laboratoryjnych, opracowaniu wyników i przygotowaniu pracy do druku (autor korespondencyjny). Mój udział procentowy szacuję na 80%.

Z-5: Arent Z., Gilmore C., San-Miguel Ayanz J.M., Quevedo Neyra L., García-Peña F.J.: Molecular epidemiology of *Leptospira* serogroup Pomona infections among wild and domestic animals in Spain. *EcoHealth* 2017, 14, 48-57.

IF₂₀₁₆=2,252; MNiSW₂₀₁₆= 30 pkt.; liczba cytowań= 3

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

Łączna punktacja prac wchodzących w skład jednotematycznego cyklu publikacji:

- łączny współczynnik wpływu *impact factor* według listy JCR: **10,841**
- Według listy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego: **165 pkt**

Dla publikacji nr Z-4 i Z-5 opublikowanych w 2017 roku podano aktualne dane z roku 2016.

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

Wstęp

Leptospiroza jest chorobą o dużym znaczeniu w zakresie zdrowia ludzi i zwierząt, wywoływaną przez bakterie z rodzaju *Leptospira*. Obecnie odnotowuje się w świecie powrót zainteresowania tą chorobą, szczególnie w odniesieniu do strat związanych z zaburzeniami w rozrodzie zwierząt hodowlanych, sposobów ograniczenia zakażeń u ludzi, oraz roli dzikich zwierząt w epidemiologii tych zakażeń. U zakażonych zwierząt, będących nosicielami zarazka, mikroorganizmy te mogą przez dłuższy czas utrzymywać się w nerkach i narządach płciowych, skąd uwalniane są do środowiska, będąc źródłem zakażenia dla nowych gospodarzy. W niektórych krajach europejskich walka z tą chorobą generuje znaczne straty finansowe dla hodowców bydła, owiec i świń. Wynikają one głównie ze środków przeznaczanych na programy walki z bezpłodnością i poronieniami (Ellis, 2015).

Obecnie na podstawie badań genetycznych wyróżniono 20 różnych gatunków leptospir, w tym 10 z nich jest patogennych. Obok podziału genetycznego istnieje równoległy podział oparty na badaniach serologicznych, wykorzystujących podobieństwo epitopów eksponowanych na powierzchni komórek. Do tej pory zidentyfikowano ponad 260 patogennych serowariantów, zgrupowanych w 23 serogrupach (Levett et al., 2006; Adler and de la Peña Moctezuma 2010), których lista jest nadal aktualizowana i poszerzana (Corney et al., 2008; Paiva-Cardoso et al., 2013). Serowariant jest podstawową jednostką taksonomiczną w rodzaju *Leptospira* spp. Ze względu na słabą korelację między serologicznym i genetycznym systemem klasyfikacji, serologicznie podobne szczepy mogą być nierozróżnialne genetycznie (LeFebvre i Thiermann 1986; LeFebvre 1987). Z drugiej strony, genetycznie podobne szczepy mogą być serologicznie różne. Ostateczna identyfikacja izolatów wymaga więc zastosowania technik serologicznych i genetycznych w celu umożliwienia dokładnej identyfikacji izolatów terenowych. Zwierzęta, ze względu na rodzaj adaptacji leptospir do organizmu gospodarza, można podzielić na żywicieli naturalnych (*ang.* maintenance hosts) i przypadkowych (*ang.* accidental hosts).

Choroba naturalnie utrzymywana jest w populacji zwierząt poprzez przewlekłe zakażenie kanalików nerkowych żywicieli naturalnych, pełniących rolę rezerwuaru zarazka. Inne zwierzęta (w tym również i ludzie) mogą zostać przypadkowo zainfekowane poprzez bezpośredni kontakt z żywicielem naturalnym lub jego zakażonym moczem. Wśród zwierząt domowych bydło i owce są gospodarzami naturalnymi dla serowariantu Hardjo, świnie dla serowariantu Pomona i Bratislava, natomiast psy dla Canicola. Rola koni jako gospodarzy naturalnych nie jest w pełni potwierdzona. Z drugiej strony należy pamiętać, że wszystkie wyżej wymienione gatunki zwierząt domowych mogą być również przypadkowo zakażone innymi serowariantami, a częstotliwość takich infekcji jest zwykle związana z kontaktem tych zwierząt z innymi gatunkami.

Teoretycznie każdy z patogennych serowariantów *Leptospira* może infekować ludzi i zwierzęta domowe, ale w praktyce tylko niewielka ich liczba jest endemiczna w danym regionie czy kraju. Odzwierciedla to obecność serowariantów które zaadaptowały się do gatunków zwierząt domowych i dzikich występujących w tym rejonie, pełniących rolę żywicieli naturalnych. Jako przykład posłużyć mogą ostatnie badania przeprowadzone w północnej Portugalii (Vale-Goncalves et al., 2015). Wykazały one wysoki odsetek bydła i dzików mających kontakt z nowym serowariantem Altodouro (serogrupa Pomona), który stosunkowo niedawno wyizolowany został od myszy domowej (*Mus musculus*) w tym kraju i zidentyfikowany jako nowy serowariant, nieznany do tej pory w świecie (Paiva-Cardoso et al., 2013). Późniejsze badania serologiczne psów w Grecji wykazały wysoki odsetek zwierząt zakażonych tym właśnie serowariantem. Infekcje te nie były wcześniej rozpoznawane, gdyż nieznany wcześniej serowariant Altodouro, nie był w panelu antygenów wykorzystywanych w badaniach serologicznych. W ostatnim czasie nowy serowariant *Leptospira* został również wyizolowany w Irlandii. Po przebadaniu jedynie 18 zębiełków myszaty (*Crocidura russula*, gatunek ssaka z rodziny ryjówkowatych) udało się wyhodować aż 3 izolaty. Analiza DNA potwierdziła, że te nowe izolaty należą do *Leptospira alstonii*, unikalnego patogennego gatunku, z którego do tej pory opisano w świecie tylko 6 izolatów pochodzących z Chin oraz Japonii, których nigdy wcześniej nie izolowano od ssaków (Nally et al., 2016). Identyfikacja szczepów *Leptospira* występujących na danym obszarze geograficznym jest niezbędna do wdrożenia odpowiednich środków kontrolnych i zapobiegawczych tych zakażeń u ludzi i zwierząt.

Cel badania

W ostatnich latach, wykazywano zróżnicowanie genetyczne nie tylko w obrębie gatunku, ale też serowariantu, schodząc do poziomu typu genetycznego (genotypu). Nieliczne badania wskazują na dużą zależność pomiędzy typem genetycznym, a jego adaptacją do danego gatunku żywiciela. W związku z tym izolacja i pełna identyfikacja szczepów występujących na danym obszarze geograficznym jest niezbędna do określenia jego żywicieli naturalnych, stanowiących rezerwuara zarazki. Wiedza ta jest niezbędna, aby skutecznie móc wdrożyć środki kontroli tych zakażeń i ograniczyć ich wpływ na zdrowie ludzi i zwierząt. Pierwszą część moich badań, wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, obejmuje przeglądowe badanie koni w Polsce północnej. Poza pojedynczymi przypadkami nie posiadamy w Polsce szczepów leptospir wyizolowanych od koni na terenie naszego kraju. Skłoniło to do przeprowadzenia badań serologicznych w celu oceny sytuacji epidemiologicznej u tego gatunku zwierząt. W dalszej części swoich badań skupiłem się na analizie genetycznej szczepów wyizolowanych od zwierząt domowych i dzikich w kilku krajach europejskich i należących do dwóch, bardzo ważnych z punktu widzenia hodowli zwierząt serogrup: Australis i Pomona. Wyniki tych badań pozwoliły lepiej poznać sytuację epidemiologiczną tych zakażeń na kontynencie europejskim. W większości badania te przeprowadziłem w Referencyjnym Laboratorium OIE ds. Leptospirozy w Belfaście, UK.

Szczegółowe cele mojej pracy zaprezentowanej w serii jednotematycznych publikacji to:

- I. Ocena występowania zakażeń *Leptospira* spp. u koni w Polsce północnej oraz próba zidentyfikowania najczęściej występujących u tego gatunku serowariantów.
- II. Analiza genetyczna europejskich szczepów *Leptospira* serogrupy Australis wyizolowanych od koni.
- III. Analiza genetyczna szczepów serogrupy Australis wyizolowanych od dzikich i domowych zwierząt w Zjednoczonym Królestwie Wielkiej Brytanii i Irlandii Północnej (UK).
- IV. Analiza genetyczna szczepów *Leptospira* serogrupy Pomona wyizolowanych od dzikich i domowych zwierząt w UK oraz Hiszpanii.

Zakażenia *Leptospira* spp. u koni (publikacja Z-1, Z-2)

Z wielu opublikowanych badań wynika, że konie mogą ulegać zakażeniom wieloma serowariantami leptospir. Zakażenia te mogą wywoływać ostrą postać kliniczną, przebiegającą z gorączką, depresją, anoreksją i żółtaczką oraz postać przewlekłą, której objawem mogą być poronienia w późnym okresie ciąży, rodzenie martwych płodów, przedwczesne porody, jak również nawracające zapalenie błony naczyniowej oka (*ang.*: equine recurrent uveitis - ERU), zwanego potocznie ślepotą księżycową lub miesięczną (Ellis et al., 1983a; Ellis and O'Brien 1988; Turk et al., 2013). Objawy okulistyczne na początku infekcji na ogół nie występują lub są bardzo łagodne. Rozwijają się zazwyczaj przez wiele miesięcy lub lat od momentu zakażenia (Gilger, 2010).

Teoretycznie wszystkie patogenne leptospiry mogą infekować konie, ale w praktyce tylko niewielka liczba serowariantów jest endemiczna w danym regionie czy kraju. W regionach tropikalnych serowariant *Icterohaemorrhagiae* wydaje się być najczęstszym zakażeniem u koni. Przypadki zakażeń w Ameryce Północnej są najczęściej związane z serowariantem Pomona typ Kennewicki, natomiast w Europie Australis i *Grippotyphosa* występują najczęściej.

Pierwsza część mojej pracy obejmuje badania mające na celu oszacowanie stopnia rozprzestrzenienia się tych zakażeń u koni w Polsce północnej oraz identyfikację najczęściej występujących serowariantów na tym terenie. W tym celu przetestowałem 1588 surowic pochodzących od koni. Próbkę badano za pomocą odczynu aglutynacji mikroskopowej (OAM), z użyciem 17 żywych antygenów leptospir. Na podstawie przeprowadzonych badań okazało się, że 620 koni (39,0%) wykazywało obecność przeciwciał w mianie 1: 100 lub więcej z co najmniej jednym z 17 serowariantów. Najczęstsze reakcje dotyczyły serogrupy *Grippotyphosa* (11,7%). Powszechna ekspozycja koni na te patogeny jest zgodna z wynikami podobnych badań przeprowadzonych na koniach w naszej części kontynentu (Brem et al., 1999; Wollanke et al., 2001). Charakterystyka europejskich izolatów leptospir, wyizolowanych z tkanek oka koni cierpiących na nawracające zapalenie błony naczyniowej (Hartskeerl et al., 2004) potwierdziła, że większość z nich należała do serogrupy *Grippotyphosa*, w której zidentyfikowano dwa serowarianty: *Grippotyphosa* (bardzo podobny do szczepu Duyster wyizolowanego w Holandii od człowieka) oraz serovar Dadas.

Drugą najbardziej rozpowszechnioną w Polsce północnej serogrupą było Sejroe (4,5%). Trzy serowarianty należące do tej serogrupy, mianowicie Hardjo, Sejroe i Saxkoebing są powszechnie izolowane w Europie. Mimo, że serowariant Hardjo został wyosobniony od koni w innych częściach Europy (Ellis, 1999), to w moich badaniach reakcje z tym antygenem nie były częste. Z tego też względu reakcje te należy przypisywać serowariantom Sejroe lub Saxkoebing. Oba były izolowane od wielu małych gryzoni w Europie, które stanowią ich naturalny rezerwuar.

Kolejną pod względem ilości reakcji pozytywnych serogrupą było Australis (4,0%). Według niektórych autorów, przedstawiciele tej serogrupy mogą być jedynymi zaadaptowanymi u koni, które mogą pełnić rolę naturalnych żywicieli (Ellis 1999; Rocha i inni 2004). Inne serogrupy, przeciwko którym wykrywałem przeciwciała na poziomie większym niż 1%, to Javanica, Pomona i Icterohaemorrhagiae. Wszystkie były wcześniej izolowane od koni w Europie (Ellis et al., 1983a,b; Hartskeerl et al., 2004), a obecność przeciwciał przeciwko nim również często stwierdzano u innych zwierząt domowych w Polsce, co potwierdzać może ich endemiczne występowanie na terenie naszego kraju (Krawczyk 1999; Czopowicz et al., 2011).

Badania serologiczne i bakteriologiczne w kilku innych krajach wykazały, że częstość występowania poszczególnych serowariantów u koni może się znacznie różnić w zależności od regionu geograficznego. Powszechnie występujące reakcje świadczące o zakażeniach serogrupą Australis odnotowywano w zachodniej części Europy, podczas gdy w środkowej części kontynentu dominowały infekcje serowariantem Grippotyphosa. Dla potwierdzenia, szczepy należące do tych dwóch grup serologicznych były wcześniej izolowane z materiału klinicznego, pochodzącego z przypadków uveitis u koni, czy też z poronionych płodów (Ellis et al., 1983a; Hartskeerl et al., 2004). Badania własne, które zostały opisane w publikacji **Z-1** wykazały, że Grippotyphosa jest również dominującym serowariantem w Polsce. Biorąc jednak pod uwagę fakt, że wyniki badań bakteriologicznych w naszym kraju są znacznie ograniczone, ostateczny komentarz na temat epidemiologii zakażenia Grippotyphosa u koni wymaga dalszych badań. To, czy konie są długotrwale zakażone jakimkolwiek z tych patogennych leptospir, tak jak jest w przypadku naturalnych żywicieli pozostaje do ustalenia, ponieważ można to ocenić jedynie za pomocą badań bakteriologicznych i pełnej identyfikacji izolatów.

Dalsza część moich badań nad zakażeniami *Leptospira* spp. u koni dotyczyła izolatów należących do serogrupy Australis, wyizolowanych od tego gatunku zwierząt w Europie.

Wyniki tych badań zostały opisane w publikacji **Z-2**. W taksonomii *Leptospira* serogrupę Australis reprezentuje ponad dziesięć serowariantów. Wcześniejsza identyfikacja serologiczna izolatów europejskich należących do tej serogrupy wykazała, że zakażenia te powodowane są dwoma blisko spokrewnionymi serowariantami, mianowicie Bratislava i Muenchen. Są to jedyne serowarianty, które mogły zaadoptować się u koni, które to zwierzęta mogą stanowić ich naturalny rezerwuuar. Przypuszczenia te oparte zostały na podstawie wysokiego odsetka koni seropozytywnych w Irlandii Północnej, oraz dużej ilości izolatów pozyskanych od koni (Ellis et al., 1983b).

Częstotliwość występowania zakażeń *Leptospira* należącymi do serogrupy Australis w Europie jest wysoka zarówno u zwierząt dzikich, jak i domowych. Jednak wyraźne są różnice pomiędzy gatunkami zwierząt. Konie wydają się być bardziej podatne na infekcje wywołane przez serowarianty Bratislava i Muenchen niż inne domowe zwierzęta roślinożerne. Dowodzą tego wyniki badań z Irlandii Północnej, w której izolaty tych serowariantów pochodzące od bydła stanowią zaledwie 0,9% wszystkich szczepów leptospir izolowanych od tego gatunku; u owiec stanowią mniej niż 7% wszystkich izolatów, natomiast u koni stanowią one aż 43% wszystkich wyizolowanych szczepów. Pomimo wysokiej częstotliwości pozytywnych reakcji serologicznych przeciwko serogrupie Australis uzyskiwanych w badaniach przeglądowych w świecie, epidemiologia tych zakażeń u koni, a w szczególności poznanie występujących serowariantów oraz gatunków zwierząt pełniących rolę ich rezerwuuarów jest bardzo słabo poznana. Przyczyną tego stanu rzeczy są niewątpliwe trudności związane z izolacją tych drobnoustrojów, których wyosobnienie konieczne jest do dalszej identyfikacji na poziomie serowariantu oraz typu genetycznego. Próbując wyjaśnić niektóre aspekty epidemiologii tych zakażeń, poddałem analizie genetycznej szczepy należące do serogrupy Australis izolowane od koni w Europie. W trakcie tych badań przeanalizowałem 21 takich izolatów, w tym: 11 szczepów pochodzących z Irlandii Północnej, 8 z Niemiec, 1 z Holandii oraz 1 z Portugalii. Wszystkie izolaty badałem za pomocą analizy restrykcyjnej (*ang.* restriction endonuclease analysis - REA) oraz analizy zmiennej liczby powtórzeń tandemowych wielu loci (*ang.* Multiple Locus Variable Number Tandem Repeats Analysis - MLVA). Konwencjonalne, serologiczne typowanie izolatów nie jest w stanie wykazać różnic w szczepach zaadaptowanych do zwierząt domowych czy też dzikich i dać pełny wgląd w te zagadnienia. Zastosowanie analizy restrykcyjnej pozwoliło wykazać nie tylko różnice genetyczne pomiędzy serowariantami w serogrupie Australis, ale również pokazało różnice na niższym poziomie, pozwalając rozróżnić genotypy w obrębie jednego serowariantu.

Przy użyciu metody REA udało się zidentyfikować cztery wyraźnie różne genotypy, dwa będące serowariantami Bratislava: B1 i B2a oraz dwa będące serowariantem Muenchen: M1 i M2a. Przy użyciu analizy MLVA otrzymano więcej profili DNA, które udało się zgrupować w trzy główne grupy filogenetyczne: Muenchen M, Bratislava B1 i Bratislava B2a.

Najwięcej izolatów koni (52,4%) należało do genotypu - B2a. W porównaniu z wynikami uzyskanymi w badaniach takich szczepów u innych gatunków zwierząt, jest to powszechna infekcja, występująca zarówno u zwierząt domowych jak i dzikich. Profil REA typu B1 odpowiada profilowi szczepu referencyjnego Bratislava (szczep Jez Bratislava). Wcześniej udało się go wyizolować tylko raz od jeża (*Erinaceus*). W moich badaniach typ ten zidentyfikowano w przypadku 5 (23,8%) szczepów końskich, wyizolowanych w czterech krajach europejskich (Niemcy, Holandia, Irlandia Północna, Portugalia). Muenchen typ M1, który jest typowym profilem genetycznym dla szczepu referencyjnego serowariantu Muenchen (szczep München C90), nigdy nie był izolowany od innych gatunków zwierząt. Trzy szczepy o takim profilu, uwzględnione w moich badaniach pochodziły z Niemiec. Jest wysoce prawdopodobne, że typ ten występuje jedynie w tej części Europy. Wszystkie szczepy M1 były izolowane z przypadków zapalenia błony naczyniowej oka, a to zaburzenie występuje głównie w centralnej części kontynentu europejskiego, w przeciwieństwie do wysp Brytyjskich, gdzie notowane jest znacznie rzadziej (Lowe, 2010; Spiess, 2010). Profile MLVA izolatów oznaczonych jako M1 nie zostały zgrupowane z profilem szczepu referencyjnego Muenchen C90. Szczep referencyjny został wyizolowany od człowieka Niemczech w 1942 roku (Rimpau, 1942). Różnica może sugerować znaczącą mutację na przestrzeni lat dotyczącą serowariantu Muenchen lub wskazywać na różnice genetyczne pomiędzy szczepami pochodzącymi od różnych żywicieli.

Muenchen typ M2a został zidentyfikowany w przypadku 2 (9,5%) izolatów pochodzących od koni. Genotyp ten jest jednym z najczęstszych izolatów świń (Ellis 1989; Ellis et al., 1991). W Wielkiej Brytanii mysz leśna (*Apodemus flavicollis*) i nornik zwyczajny (*Microtus arvalis*) jako żywiciele naturalni stanowią jego rezerwuar (Hathaway i inni., 1983). Jednak w Irlandii Północnej, w której populacja norników nie występuje, a badania hodowlane nie wykazały nosicielstwa żadnych szczepów kompleksu Bratislava/Muenchen u mysz leśnych, Ellis et al., (1991) wykazali, że typ genetyczny Muenchen M2a zaadoptował się do trzody chlewnej. Świnie stanowią jego naturalny rezerwuar. W moich badaniach dwa szczepy typu M2a wyizolowane od koni: jeden w Irlandii Północnej, a drugi w Niemczech – prawdopodobnie są

przykładem typowych infekcji przypadkowych, których źródłem były inne gatunki zwierząt domowych. Większość szczepów izolowanych od dzikich zwierząt, głównie małych gryzoni, zostało wcześniej zidentyfikowanych jako serowariant Muenchen należące do genotypów oznaczonych symbolami od M2b do M2f. Te typy genetyczne nie zostały zidentyfikowane u koni. Różnice pomiędzy profilami genetycznymi szczepów zaadaptowanych u świń oraz dzikich zwierząt, a izolatami końskimi pozwalają na postawienie hipotezy, że te drugie (w szczególności typy genetyczne B1 i M1) zaadaptowały się u tego gatunku zwierząt, który może pełnić rolę żywiciela naturalnego.

Analiza molekularna szczepów *Leptospira* serogrupy Australis izolowanych od różnych gatunków zwierząt w Wielkiej Brytanii.

(praca Z-3)

Jak wspominałem w poprzedniej części, przedstawiciele serogrupy Australis należą do jednych z najczęściej izolowanych leptospir i są szeroko rozpowszechnione zarówno wśród dzikich jak i domowych gatunków zwierząt w Europie. Infekcje te oprócz koni są często stwierdzane również u świń i psów. Epidemiologia tych zakażeń nie jest do końca jasna. Już w 1983 roku Hathaway i inni (Hathaway et al., 1983) zasugerowali, że zwierzęta wolno żyjące stanowią główne źródła infekcji dla zwierząt domowych. W przeciwieństwie do tego poglądu, liczne wyniki przeglądów serologicznych, poparte izolacjami bakteriologicznymi, wskazywały na istnienie endemicznych infekcji także u świń i koni. Dało to podstawy do stwierdzenia, że świnie, a być może także konie i psy, pełnią rolę naturalnych żywicieli dla serowariantów Bratislava i Muenchen. To nie zwierzęta dzikie są głównym źródłem takich infekcji u trzody chlewnej.

W moich badaniach, opisanych w publikacji Z-3 zostały przebadane szczepy wyizolowane od różnych gatunków zwierząt dzikich i domowych z terenu Wysp Brytyjskich. Za pomocą analizy genetycznej, podjąłem próbę wyjaśnienia aspektów epidemiologicznych tych zakażeń w UK, a w szczególności ocenę znaczenia zwierząt domowych i dzikich w pełnieniu roli rezerwuaru tych zarazków. Przebyłem 247 izolatów leptospir należących do serogrupy Australis. Szczepy te były wcześniej wyizolowane od 13 gatunków zwierząt domowych i dzikich. Większość izolatów wyhodowano z materiału patologicznego: poronionych płodów (51), loch, które poroniły (50), prosiąt z zapaleniem opon mózgowych (11). Pozostałe izolaty

pochodziły od knurów z gospodarstw, w których uzyskano płody z dodatnim wynikiem hodowli bakteryjnej (39) lub izolowano od świń, u których nie stwierdzono widocznych objawów klinicznych (pobrane poubojowo, w rzeźni - 6). Większość izolatów psów (14) pochodziła z przypadków klinicznych. Wszystkie izolaty owcze uzyskano z poronionych płodów, natomiast bydłęce pozyskano z materiału rzeźnego. Izolaty pochodzące od gatunków dzikich uzyskano od zwierząt bez znanego statusu klinicznego.

Próbki testowano za pomocą analizy restrykcyjnej (REA), analizy zmiennej liczby powtórzeń tandemowych wielu loci (MLVA) oraz sekwencjonowania fragmentu 245 bp genu *secY*. Zmienność genetyczna szczepów pochodzących z Irlandii Północnej (*ang.* Northern Ireland - NI) była mniejsza w porównaniu do szczepów pochodzących z Wielkiej Brytanii (*ang.* Great Britain - GB) (Irlandia Północna - 4 genotypy, Wielka Brytania – 7 genotypów). Wyniki te nie były dla mnie zaskakujące, głównie z uwagi na fakt, że w Wielkiej Brytanii występuje większa różnorodność i liczba dzikich zwierząt, a także izolaty pochodziły z dużo większego obszaru geograficznego - od Szkocji po południową Anglię. Analizowane izolaty oznaczone jako genotyp B1 znaleziono tylko w NI. Izolaty oznaczone jako B2b występowały również jedynie na terenie NI, natomiast izolaty B2a były stwierdzane w całym UK. W obrębie genotypu M2 stwierdzano podtypy: M2a w całym UK, natomiast podtypy M2b do M2f występowały tylko w GB.

Poza różnicami regionalnymi, które mogłem zaobserwować, występowały również istotne różnice w występowaniu różnych genotypów w zależności od gatunku zwierzęcia od którego były izolowane. Genotyp B2b występował tylko u świń. W przypadku braku innych zidentyfikowanych gospodarzy rozsądne jest stwierdzenie, że te szczepy zaadaptowały się do tego gatunku zwierząt. Izolacja tego genotypu była ściśle związana z przypadkami zaburzeń w rozrodzie. Zatem kontrola zakażeń powodowanych przez genotyp B2b powinna być ukierunkowana na kontrolę w populacji świń.

Izolaty serowariantu Bratislava oznaczone jako genotyp B2a, także związane z przypadkami klinicznymi u świń, były również izolowane od koni, psów i różnych gatunków zwierząt dzikich. Z wyników tych nie można wyciągnąć jednoznacznych wniosków co do roli każdego gatunku w epidemiologii zakażeń genotypem B2a. Jest wysoce prawdopodobne, że rezerwuarem tych zakażeń w środowisku jest wiele gatunków zwierząt. Nie można wykluczyć również przypuszczenia, że w obrębie tego podtypu istnieją dalsze różnice genetyczne, które mogłyby wskazać na szczególną adaptację do konkretnego gospodarza,

ale których zastosowana w moich badaniach metodologia nie była w stanie wykazać. Szczepy, które do tej pory izolowane były jedynie od zwierząt dzikich, oznaczone symbolami M2b do M2f, mogą mieć mniejsze znaczenie jako potencjalne patogeny zwierząt domowych. Jednak nie można w ich przypadku wykluczyć zakażeń przypadkowych u zwierząt domowych.

Przedstawione wyniki badań wskazują przede wszystkim na potrzebę kontrolowania infekcji serowariantami Bratislava i Muenchen w stadach świń. Idealnie byłoby, gdy kontrola takich zakażeń obejmowała genotypy których rezerwuarem jest trzoda chlewna (podtypy Bratislava B2a i B2b oraz Muenchen podtyp M2a) oraz szczepy których rezerwuarem mogą być inne gatunki zwierząt, tym bardziej, że 16 świń objętych badaniem miało mieszane infekcje różnymi serowariantami lub mieszane infekcje różnymi genotypami serowariantu Bratislava. Izolacja dwóch serowariantów lub dwóch genotypów od jednego zwierzęcia wskazuje, że naturalna infekcja przez jeden serowariant lub genotyp może nie zawsze zapewniać odporność na infekcję wywoływaną przez szczep heterologiczny.

Tylko jeden genotyp znalazł się wśród szczepów izolowanych od psów, mianowicie B2a. Jednak był on izolowany równie często od innych gatunków zwierząt. Nie należy zapominać, że brak różnic może być odzwierciedleniem słabości zastosowanych metod do głębszego zróżnicowania szczepów zgrupowanych w genotypie B2a. Jednak niewykluczone jest, że w erze intensywnego rozwoju coraz to czulszych metod analizy genetycznej, możliwe będzie w przyszłości rozróżnienie podtypów w obrębie tego genotypu, charakterystycznych dla poszczególnych gatunków zwierząt, w tym psów. Istnieją pewne poszlaki sugerujące, że szczepy izolowane od psów mogą mieć cechy wyróżniające je od izolatów pochodzących od innych gatunków, o czym np. świadczyć może dużo większa trudność ich izolacji i adaptacji do sztucznych podłoży w warunkach laboratoryjnych, w porównaniu do szczepów tego genotypu, izolowanych od innych gatunków zwierząt.

**Analiza molekularna szczepów *Leptospira* serogrupy Pomona w Wielkiej Brytanii i Hiszpanii
(publikacja Z-4 i Z-5)**

Serowarianty należące do serogrupy Pomona (obok Icterohaemorrhagiae i Australis) są również jednymi z najczęściej izolowanych od zwierząt na całym świecie, a niektóre z nich zaadaptowały się u świń, pełniąc rolę rezerwuaru tego patogenu (Ellis, 2012). Infekcje trzody chlewnej powodowane serowariantem Pomona często występują w Europie, szczególnie w jej wschodniej i południowej części, natomiast badania przeglądowe świń w Wielkiej Brytanii

wykazały bardzo niski poziom lub brak wyraźnych dowodów na ekspozycję tego zarazka wśród tamtejszego pogłowia. Oprócz świń, serowariant Pomona jest również klinicznie i ekonomicznie istotny u bydła, owiec i koni, szczególnie w odniesieniu do strat reprodukcyjnych oraz problemów okulistycznych u koni (Ellis, 2015).

Klasyczna serologiczna identyfikacja wszystkich przedstawicieli serogrupy Pomona była bardzo trudna ze względu na bardzo bliskie podobieństwo antygenowe pomiędzy poszczególnymi szczepami (Terpstra et al., 1987). Biorąc pod uwagę klasyfikację genotypową, przedstawiciele serogrupy Pomona występują w czterech gatunkach, mianowicie *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii* i *L. santarosai*, ale tylko dwa z nich, *L. interrogans* z serowariantem Pomona oraz *L. kirschneri* z serowariantami Mozdok, Tsaratsovo i Altodouro były izolowane w Europie. Podobnie jak w przypadku serogrupy Australis wprowadzenie narzędzi molekularnych wykazało różnice między szczepami na poziomie niższym niż serowariant. Na tej podstawie, w obrębie serowariantu Pomona (sensu lato, s.l.) wyróżniono typ Pomona (sensu stricto, s.s.), Kennewicki i Monjakov (Hathaway i inni 1985a). Pomimo dużego podobieństwa antygenowego, różne typy wykazują znaczące różnice w patogenności. Zakażenie kliniczne zwierząt gospodarskich przez typ Kennewicki może przebiegać w postaci ostro przebiegającego zachorowania, objawiającego się gorączką, zazwyczaj u młodych zwierząt, wynaczynieniami, krwiomoczem, żółtaczką, objawami niewydolności nerek. Takie zakażenia doprowadzają do poważnych strat finansowych dla hodowców w Ameryce Północnej, Australii i Nowej Zelandii (Ellis, 2012). Natomiast szczepy serowariantu Pomona identyfikowane zwykle jako typy Pomona s.s. lub Monjakov, pomimo, że mogą doprowadzać do zaburzeń w rozrodzie, nie wydają się stanowić tak istotnego zagrożenia dla zwierząt domowych. Podobnie szczepy serogrupy Pomona należące do gatunku *L. kirschneri*, których naturalnymi żywicielami są małe gryzonie, chociaż mogą powodować zakażenia przypadkowe u zwierząt domowych, to jednak mają mniejsze znaczenie gospodarcze dla hodowli (Ellis, 1991; Hathaway et al., 1984).

W Wielkiej Brytanii, w szczególności w południowej Anglii, w ciągu ostatnich 40 lat obserwowano bardzo rzadkie przypadki klinicznej choroby wywołanej przez przedstawicieli serogrupy Pomona. Szczepy wyizolowane z takich ognisk choroby zostały wcześniej zidentyfikowane jako należące do serowariantu Mozdok i w większości były wyosobnione od małych gryzoni w tych ogniskach. Szczepy te zostały również uznane za możliwą przyczynę problemów reprodukcyjnych u zwierząt hodowlanych (Barlow, 2004; Hathaway et al., 1984;

Pritchard et al., 1987). Z drugiej strony, sporadyczna izolacja szczepów zidentyfikowanych jako *Leptospira interrogans* serowariant Pomona s.l. w Irlandii Północnej, a ostatnio w Anglii, sugeruje potencjalne zagrożenie dla zwierząt hodowlanych w Wielkiej Brytanii. W tej części mojej pracy podjąłem próbę wyjaśnienia niektórych aspektów epidemiologii tych zakażeń w UK. Wychodząc z założenia, że różne typy serowariantu Pomona s.l. mają różne znaczenie dla hodowli zwierząt gospodarskich, analiza genetyczna szczepów północno irlandzkich i brytyjskich może pomóc w ocenie zagrożenia, jakie niosą pojedyncze jak dotąd, przypadki takich zakażeń na terenie UK. W tym celu 9 izolatów *Leptospira interrogans* serowariant Pomona s.l. pozyskanych od różnych gatunków zwierząt w Irlandii Północnej i jeden szczep wyizolowany od ryjówki aksamitnej (*Sorex araneus*) w Anglii, użyłem w badaniach opisanych w publikacji **Z-4**. Szczepy północnoirlandzkie izolowano od poronionych lub martwo urodzonych zwierząt lub z nerek przypadkowo wybranych zwierząt w rzeźni. Natomiast ryjówka od której wyizolowano szczep w Anglii została odłowiona na fermie świń, w której zaobserwowano zaburzenia w rozrodzie i wykryto miana serologiczne dla serowariantu Pomona u macior, które wcześniej poroniły.

Na podstawie badań metodą PCR, z użyciem gatunkowo-specyficznych starterów potwierdzono, że wszystkie wyosobnione szczepy (10) należą do gatunku *Leptospira interrogans*. Natomiast porównując profile genetyczne izolatów, które uzyskałem po trawieniu całego genomu enzymami EcoRI i AluI i HpaII, podzieliłem je na dwa genotypy (oznaczone jako P1 i P2). Genotyp P1 był identyczny z profilem DNA referencyjnego szczepu typu Pomona s.s. i został zidentyfikowany we wszystkich szczepach izolowanych w Irlandii Północnej od zwierząt domowych. Natomiast genotyp P2 został przypisany szczepowi wyizolowanemu od ryjówki w Anglii w 2011 roku. Badania te potwierdziły, że wszystkie izolaty *L. interrogans* serowariant Pomona s.l. , należą do typu Pomona s.s., a nie do stanowiącego większe zagrożenie dla hodowli typu Kennewicki. Typ Pomona s.s. nie zaadaptował się do gatunków zwierząt domowych, co ma duże znaczenie w rozprzestrzenianiu się tych zakażeń (Ellis, 2012).

Izolacja serowariantu Pomona od ryjówki aksamitnej sugeruje, że gryzoń ten może stanowić rezerwar dla takich szczepów i stanowić źródło przypadkowych zakażeń dla zwierząt domowych (Ellis, 2015). Niestety, ze względu na wcześniejsze leczenie antybiotykami nie podjęto próby izolacji tych bakterii od dotkniętych tą infekcją macior. Natomiast izolacja serowariantu Pomona w Irlandii Północnej od zwierząt domowych jest pewną zagadką. Na

wyspie tej nie występują ryjówki aksamitne ani żaden inny gatunek gryzoni, który stanowiłby znany rezerwuar dla serowariantu Pomona. Ponadto przeglądowe badania serologiczne owiec, bydła, a w szczególności świń w Irlandii Północnej nie potwierdziły występowania takich zakażeń u zwierząt. Przypuszczać możemy, że do zakażeń koni, od których wyizolowano te patogeny, doszło poza Irlandią, gdyż niewątpliwie konie są gatunkiem który często przekracza granice państw.

Druga część moich badań na szczepami serogrupy Pomona dotyczyła szczepów wyizolowanych w Hiszpanii. Wyniki tych badań przedstawiłem w publikacji **Z-5**. Badania te pokazały, że *Leptospiry* należące do serogrupy Pomona są szeroko rozpowszechnione wśród dzikich i domowych zwierząt w tym kraju. Wraz z wcześniejszymi badaniami przeprowadzonymi w Portugalii pokazuje to, że są one jednym z najczęstszych izolatów *Leptospira* izolowanych od zwierząt na Półwyspie Iberyjskim. Ogniska zakażenia Pomona są regularnie obserwowane, doprowadzając do ronień u zwierząt i przynosząc straty ekonomiczne dla rolników (Bonilla et al., 1983; Vizcaino et al., 1987, 1977).

Pomimo faktu, że zakażenia serogrupą Pomona są powszechnie diagnozowane metodami serologicznymi w Hiszpanii, dane dotyczące występowania poszczególnych serowariantów należących do tej serogrupy są znikome. Test aglutynacji mikroskopowej (MAT), szeroko stosowany w badaniach serologicznych, jest serogrupowo-specyficzny i nie identyfikuje zakażenia na poziomie serowariantu i dalszych typów genetycznych. Jednak do celów epidemiologicznych niezbędna jest dokładna identyfikacja występujących szczepów i poznanie ich naturalnych rezerwuarów, szczególnie kiedy chcemy zastosować odpowiednie środki kontroli tych zakażeń.

Analizowane przeze mnie szczepy *Leptospira* izolowane były od zwierząt domowych i dzikich w Centralnym Laboratorium Weterynaryjnym (Laboratorio Central de Veterinaria (LCV) Algete, Madryt. Izolaty zostały wcześniej zidentyfikowane na poziomie serogrupy przy zastosowaniu aglutynacji krzyżowej i serogrupowo-swoistych surowic króliczych. Ze wszystkich izolatów 64 należały do serogrupy Pomona, 8 do serogrupy Australis, 7 do serogrupy Ballum, 4 do serogrupy Sejroe i 2 do serogrupy Icterohaemorrhagiae. Spośród wszystkich 64 szczepów zidentyfikowanych jako serogrupa Pomona-43 z powodzeniem udało się przechować w stanie pozwalającym na przeprowadzenie dalszych badań. Izolaty od zwierząt gospodarskich (12 bydłowych i 2 pochodzące od świń), pochodziły ze stad, w których notowano poronienia oraz stwierdzano wysokie miana przeciwciał przeciwko serogrupie

Pomona. Pozostałe izolowano od gryzoni: 12 szczepów odzyskano od szczurów śniadych (*Rattus rattus*), 9 od myszy śródziemnomorskich (*Mus spretus*), 7 od myszy zaroślowych (*Apodemus sylvaticus*) i 1 od myszy domowej (*Mus domesticus*). Wszystkie gryzonie od których wyizolowano leptospiry zostały odłowione na fermach, na których występowały poronienia i miana przeciwko Pomona.

Za pomocą gatunkowo-specyficznych reakcji PCR ustaliłem, że wśród badanych izolatów 9 należało do gatunku *Leptospira interrogans*, natomiast pozostałe 34 izolaty do gatunku *Leptospira kirschneri*. Analiza badanych szczepów wykazała, że profile REA wskazują na serowariant Pomona, jednak profil ten nie był identyczny z żadnym referencyjnym typem tego serowariantu, a mianowicie Pomona *sensu stricto*, Monjakov i Kennewicki. Wyróżniono trzy profile genowe, swoiste dla szczepów hiszpańskich i oznaczono je symbolami SP1, SP2 i SP3 (SP-Spanish Pomona). Profile izolatów analizowano następnie pod kątem związku między gatunkiem gospodarza i miejscem, z którego zostały wyizolowane. Profil SP1 wyizolowano od świń i bydła w regionie Cáceres, SP2 od bydła w Cádiz i Toledo, ale SP3 od bydła w Galicji. Wyniki te mogą znacznie przyczynić się do zrozumienia epidemiologii tych zakażeń oraz być użyteczne w dochodzeniu epidemiologicznym.

Spośród 34 izolatów zidentyfikowanych jako *L. kirschneri*, 12 zostało wybranych do dalszej analizy REA, w tym wszystkie izolaty bydłące (5) oraz wybrane izolaty pochodzące od gryzoni (7). Profile produktów uzyskanych po trawieniu enzymami restrykcyjnymi DNA badanych izolatów były identyczne z profilem szczepu referencyjnego serowariantu Mozdok i znacząco różniły się od pozostałych szczepów referencyjnych *Leptospira kirschneri*, a mianowicie serowariantu Tsaratsovo, Kunming i Altodouro. Profile REA, dla badanych izolatów tego gatunku, były identyczne i nie zaobserwowano różnic związanych z różnymi gatunkami zwierząt od których były izolowane, czy też różnego pochodzenia geograficznego.

Wszystkie 9 szczepów zidentyfikowanych jako serowariant Pomona wyizolowano jedynie od zwierząt domowych, świń i bydła. W przypadku serowariantu Mozdok 29 (85,3%) szczepów pochodziło od małych dzikich ssaków i 5 (14,7%) od bydła mięsnego. Potwierdza to hipotezę, że rezerwuarem serowariantu Pomona w Hiszpanii są zwierzęta gospodarskie i w związku z tym zakażenia te mogą się łatwo rozprzestrzeniać między zwierzętami na fermach. Rezerwuarem serowariantu Mozdok są małe gryzonie, które mogą stanowić źródło przypadkowych zakażeń dla zwierząt domowych.

W zachodniej i południowej Hiszpanii (Cáceres, Badajoz i Cádiz) stada bydła mięsnego są głównie wypasane na pastwiskach z dodatkowym dokarmianiem w porze suchej. Na wielu fermach bydło dzieli te pastwiska ze świniami iberyjskimi. W północnej Hiszpanii (Galicja) stosowany jest głównie system półekstensywny, wykorzystujący pobliskie pastwiska, które z reguły nie są dzielone z innymi gatunkami. Jednak w obu rodzajach systemów kontakt z dzikimi zwierzętami jest możliwy, gdyż zwierzęta domowe jak i małe gryzonie wykorzystują te same obszary bytowania.

Osiągnięcia:

- Badania serologiczne koni w Polsce północnej wykazały, że jest to powszechne zakażenie, które należy brać pod uwagę przy diagnozowaniu problemów rozrodczych i nawracającego zapalenia błony naczyniowej oka. Analiza serowariantowa wykazała, że większość zakażeń jest spowodowana przez szczepy, których rozpoznaniem rezerwuarem są małe gryzonie. *Grippytyphosa* była najczęstszym zidentyfikowanym serowariantem.
- Analiza genetyczna szczepów serogrupy Australis wyizolowanych od koni została po raz pierwszy przeprowadzona w Europie. Pozwoliła ona zidentyfikować cztery typy genetyczne. Dwa z nich były izolowane tylko od koni, co może świadczyć o ich adaptacji do tego gatunku zwierząt.
- W Wielkiej Brytanii przeprowadzono obszerne badania na 247 szczepach serogrupy Australis wyizolowanych od różnych gatunków zwierząt. W wielu przypadkach badania te pozwoliły powiązać różne genotypy z gatunkami zwierząt, które stanowią ich naturalne rezerwuary.
- Na podstawie analizy genetycznej szczepów należących do *Leptospira interrogans* serowar Pomona izolowanych od zwierząt w UK wykazano, że izolaty te należą do typu Pomona s.s, a nie do bardziej patogennego typu Kennewicki. Takie rozpoznanie rzuca korzystne światło na zagrożenie jakie niosą te zakażenia dla brytyjskich ferm.
- Analiza genetyczna szczepów serogrupy Pomona wyizolowanych w Hiszpanii wykazała, że zakażenia te powodowane są przez dwa serowarianty: Pomona oraz Mozdok. W zależności od regionu geograficznego zaobserwowano różnice genetyczne pomiędzy szczepami serowariantu Pomona. Serowariant ten był izolowany tylko od zwierząt domowych, co

potwierdza hipotezę, że to one stanowią główny rezerwuuar tego zarazka w tym kraju. Natomiast wszystkie szczepy pochodzące od gryzoni zidentyfikowano jako serowariant Mozdok. Pojedyncze izolaty tego serowariantu pochodzące od bydła wskazują, że może on wywoływać zakażenia przypadkowe zwierząt gospodarskich, których źródłem są gryzonie.

Piśmiennictwo

Adler, B., de la Peña Moctezuma, A., 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol* 140, 287–296.

Barlow, A.M., 2004. Reproductive failure in sows associated with *Leptospira* mozdok from a wildlife source. *Pig J* 54, 123–131.

Bonilla, Q.P., Sanchez, E.D., Mira, J.B., 1983. Outbreak of bovine leptospirosis [in Spain]. *Point Vet* 15, 51–53, 55; 11 ref.

Brem, S., Gerbards, H., Wollanke, B., Meyer, P., Kopp, H., 1999. 35 Intraocular leptospira isolations in 32 horses suffering from equine recurrent uveitis (ERU). *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 112, 390–393.

Corney, B.G., Slack, A.T., Symonds, M.L., Dohnt, M.F., McClintock, C.S., McGowan, M.R., Smythe, L.D., 2008. *Leptospira weilii* serovar Topaz, a new member of the Tarassovi serogroup isolated from a bovine source in Queensland, Australia. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 2249–2252.

Czopowicz, M., Kaba, J., Smith, L., Szalus-Jordanow, O., Nowicki, M., Witkowski, L., Frymus, T., 2011. Leptospiral antibodies in the breeding goat population of Poland. *Vet Rec* 169, 230-U43. doi:10.1136/vr.d4403

Ellis, W.A., 2015. Animal Leptospirosis, in: Adler, B. (Ed.), *Leptospira and Leptospirosis*. pp. 99–137. doi:10.1007/978-3-662-45059-8_6

Ellis, W.A., 2012. Leptospirosis, in: Jeffrey J. Zimmerman Alejandro Ramirez, Kent J. Schwartz, Gregory W. Stevenson, L.A.K. (Ed.), *Diseases of Swine, 10th Edition*. Wiley-Blackwell, pp. 770–778.

Ellis, W.A., 1989. *Leptospira australis* infection in pigs. *Pig Vet J* 22, 83–92.

Ellis, W.A., Bryson, D.G., O'Brien, J.J., Neill, S.D., 1983a. Leptospiral infection in aborted equine foetuses. *Equine Vet J* 15, 321–324.

Ellis, W.A., Montgomery, J.M., Thiermann, A.B., 1991. Restriction endonuclease analysis as a taxonomic tool in the study of pig isolated belonging to the australis serogroup of leptospira - interrogans. *J Clin Microbiol* 29, 957–961.

Ellis, W.A., O'Brien, J.J., 1988. Leptospirosis in horses. *Equine Infect Dis V Proc fifth Int Conf* [edited by Powell, DG] Lexington, KY 40506 0336, USA; Univ Press Kentucky 168–

171.

Ellis, W.A., O'Brien, J.J., Cassells, J.A., Montgomery, J., 1983b. Leptospiral infection in horses in Northern Ireland: serological and microbiological findings. *Equine Vet J* 15, 317–320.

Gilger, B.C., 2010. Equine recurrent uveitis: the viewpoint from the USA. *Equine Vet J Suppl* 57–61.

Hartskeerl, R.A., Goris, M.G.A., Brem, S., Meyer, P., Kopp, H., Gerhards, H., Wollanke, B., 2004. Classification of *Leptospira* From the Eyes of Horses Suffering From Recurrent Uveitis. *J Vet Med Ser B-INFECTIOUS Dis Vet PUBLIC Heal* 51, 110–115.

Hathaway, S.C., Little, T.W.A., Stevens, A.E., Ellis, W.A., Morgan, J., 1983. Serovar identification of leptospire of the Australis serogroup isolated from free living and domestic species in the United Kingdom. *Res Vet Sci* 35, 64–68.

Hathaway, S.C., Todd, J.N., Headlam, S.A., Jeffrey, M., 1984. Possible role of leptospire of the Pomona serogroup in sporadic bovine abortion in the south west of England. *Vet Rec* 115, 623–626.

Krawczyk, M., 1999. Serological studies on leptospirosis in sheep. *Med Weter* 55, 397–399.

LeFebvre, R.B., 1987. DNA Probe for Detection of the *Leptospira interrogans* Hardjo Genotype Hardjo-Bovis. *J Clin Microbiol* 25, 2236–2238.

LeFebvre, R.B., Thiermann, A.B., 1986. DNA homology studies of leptospire of serogroups Sejroe and Pomona from cattle and swine. *Am J Vet Res* 47, 959–963; 10 ref.

Levett, R.E., Galloway, R.L., Bragg, S.L., Steigerwalt, A.G., Mayer, L.W., Levett, P.N., 2006. Species-Specific Identification of Leptospiraceae by 16S rRNA Gene Sequencing. *J Clin Microbiol* 44, 3510–3516.

Lowe, R.C., 2010. Equine uveitis: a UK perspective. *Equine Vet J Suppl* 46–49.

Nally, J.E., Arent, Z., Bayles, D.O., Hornsby, R.L., Gilmore, C., Regan, S., McDevitt, A.D., Yearsley, J., Fanning, S., McMahon, B.J., 2016. Emerging Infectious Disease Implications of Invasive Mammalian Species: The Greater White-Toothed Shrew (*Crocidura russula*) Is Associated With a Novel Serovar of Pathogenic *Leptospira* in Ireland. *PLoS Negl Trop Dis* 10. doi:10.1371/journal.pntd.0005174

Paiva-Cardoso, M. das N., Arent, Z., Gilmore, C., Hartskeerl, R., Ellis, W.A., 2013. Altodouro, a new *Leptospira* serovar of the Pomona serogroup isolated from rodents in northern Portugal. *Infect Genet Evol* 13, 211–217. doi:10.1016/j.meegid.2012.09.013

Pritchard, D.G., Todd, N., Barlow, A., Little, S.A., 1987. Outbreak of *Leptospira interrogans* serovar mozdok in sows in Dorset, England. *Isr J Vet Med* 43, 343.

Rimpau, W., 1942. Eine EEinteilung der Leptospirose. *Klin Wochenschr* 21, 342–343.

Rocha, T., Ellis, W.A., Montgomery, J., Gilmore, C., Regalla, J., Brem, S., 2004. Microbiological and Serological Study of Leptospirosis in Horses at Slaughter: First

Isolations. Res Vet Sci 76, 199–202.

Terpstra, W.J., Korver, H., Schoone, G.J., Leeuwen, J. Van, Schonemann, C.E., Jonge, A.S. De, Kolk, A.H.J., Van, L.J., De, J.A.S., 1987. Comparative classification of *Leptospira* serovars of the Pomona group by monoclonal antibodies and restriction endonuclease analysis. Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene A 266, 412–421; 25 ref.

Turk, N., Milas, Z., Habus, J., Majetic, Z.S., Perko, V.M., Barbic, L., Stevanovic, V., Perharic, M., Staresina, V., 2013. Equine leptospirosis in Croatia - occurrence of subclinical infections and abortions. Vet Arh 83, 253–262.

Vale-Goncalves, H.M., Cabral, J.A., Faria, M.C., Nunes-Pereira, M., Faria, A.S., Veloso, O., Vieira, M.L., Paiva-Cardoso, M.N., 2015. Prevalence of *Leptospira* antibodies in wild boars (*Sus scrofa*) from Northern Portugal: risk factor analysis. Epidemiol Infect 143, 2126–2130. doi:10.1017/s0950268814003331

Vizcaino, L., Garcia, M.A., Garcia, P.M., 1977. New outbreaks of leptospirosis in cattle and pigs in Cordoba. Supl Cient del Bol Inf Cons Gen Colegios Vet Espana No.207, 73–84; 33 ref.

Vizcaino, L., Hermoso, D.M.M., Garrido, F., 1987. Incidence of abortions caused by leptospirosis in sheep and goats in Spain. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 10, 149–153; 30 ref.

Wollanke, B., Rohrbach, B.W., Gerhards, H., 2001. Serum and Vitreous Humor Antibody Titers in and Isolation of *Leptospira Interrogans* From Horses With Recurrent Uveitis. J Am Vet Med Assoc 219, 795–800.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych (artystycznych)

Główny obszar moich zainteresowań naukowych dotyczy chorób zakaźnych zwierząt. Po obronie pracy doktorskiej, moja praca badawcza skoncentrowała się głównie na aspektach związanych z leptospirozą. Zainteresowania tą chorobą zaczęły się już pierwszych latach mojej pracy w Zakładzie Higieny Weterynaryjnej w Gdańsku, gdzie mieściło się wówczas krajowe laboratorium referencyjne tej choroby prowadzone wówczas przez dr Jolantę Kocik. W roku 2007 podjąłem pracę w Referencyjnym Laboratorium OIE ds. Leptospirozy, mieszczącym się w Agri-Food & Biosciences Institute w Belfaście, w Irlandii Północnej, prowadzonym przez prof. Williama Ellisa. Tematykę mojej działalności naukowej (z wyłączeniem prac opisanych w jednotematycznym cyklu osiągnięcia naukowego) można podzielić na główne obszary, opisane poniżej.

Etiologia Leptospirozy

Przedstawiciele rodzaju *Leptospira* stanowią różnorodną pod względem fenotypowym i genotypowym grupę organizmów. Podstawową jednostką taksonomiczną jest serowariant i do tej pory zidentyfikowano ich ponad 260. Lista ta jest nadal poszerzana i aktualizowana. Przykładem są dwa nowe serowarianty, które wyizolowane zostały w ostatnich latach w Portugalii i Irlandii. Obydwa szczepy, po izolacji w regionalnych laboratoriach, zostały przesłane do Laboratorium Referencyjnego OIE w Belfaście, w którym przeprowadziłem ich pełną identyfikację genetyczną i serologiczną. Wyniki tych analiz wskazały, że mamy do czynienia z nowymi serowariantami, do tej pory nie opisanymi. Pierwszy z nich to szczep, oznaczony jako RIM 139 i wyizolowany z nerki myszy domowej (*Mus musculus*) w regionie Trás-os-Montes e Alto Douro w północnej Portugalii. Podczas mikroskopowej identyfikacji w ciemnym polu widzenia cechował się typową dla leptospir ruchliwością oraz morfologią. W zakażeniach doświadczalnych wykazywał patogenność dla chomików. Przynależność gatunkową przeprowadzono na podstawie reakcji PCR przy zastosowaniu swoistych dla poszczególnych gatunków starterów oraz za pomocą sekwencjonowania genu *secY*. Serogrupę oznaczono przy użyciu odczynu aglutynacji mikroskopowej (OAM) z panelem poliklonalnych surowic króliczych swoistych dla znanych patogennych serogrup. Identyfikacja serowariantowa została przeprowadzona za pomocą przeciwciał monoklonalnych i testu krzyżowej absorpcji aglutynin (*ang.* cross-agglutinin absorption test CAAT). Nowatorski charakter szczepu potwierdzono za pomocą analizy restrykcyjnej (REA) całego genomu. Wyniki pokazały, że szczep RIM 139 jest przedstawicielem nowego serowariantu, należącego do serogrupy Pomona, dla którego zaproponowano nazwę Altodouro. Analiza PCR genu *ompL1* i sekwencjonowanie genu *secY* wskazały, że należy on do gatunku *Leptospira kirschneri*.

Drugi nowy serowariant został wyizolowany od zębiełka myszatego (*Crocidura russula*), bardzo inwazyjnego w Irlandii gatunku małych ssaków. Gryzoń ten został po raz pierwszy odnotowany na wyspie w 2007 r. *C. russula* stwierdzany był w Północnej Afryce, natomiast nieobecny był wcześniej na Wyspach Brytyjskich. Podczas gdy gatunki inwazyjne mogą mieć dramatyczny i szybki wpływ na przedstawicieli regionalnej fauny i flory, mogą również być rezerwuarem patogenów stanowiąc źródło zakażenia dla innych gatunków. Spośród 18 odłowionych zębiełków myszatykh wyhodowano 3 izolaty leptospir. Standardowe,

serologiczne metody typowania tych szczepów, nie pozwoliły określić serogrupy ani serowariantu. Analiza sekwencji rybosomalnego RNA 16S oraz genu *secY* wykazała, że te nowe izolaty należą do *Leptospira alstonii*, rzadko występującego w świecie patogenego gatunku, z którego do tej pory opisano tylko 6 izolatów. Wszystkie z nich pochodziły z Chin oraz Japonii i nie były wcześniej izolowane od ssaków. Analiza restrykcyjna (REA) dodatkowo potwierdziła nowy, niespotykany do tej pory profil genetyczny. Podobnie jak w przypadku innych patogenych leptospir, izolaty zawierały gen *LipL32* oraz wykazywały brak wzrostu w obecności 8-azaguaniny. Obie te cechy potwierdzają ich patogenność. Izolaty te wykazały całkiem nowy profil REA, co potwierdziło, że reprezentują one nowy serowariant, któremu nadano nazwę Room22. Badanie to wskazuje, że inwazyjne gatunki ssaków mogą być wektorami nowych patogenów odzwierzęcych, czego przykładem jest nowy serowariant *Leptospira*. Ze względu na nowatorski charakter tej bakterii, przeprowadzono również sekwencjonowanie całego genomu. Badanie to zostało przeprowadzone w Centrum Badań Genomu (*ang.* Center for Genomic Research), mieszczącym się przy Uniwersytecie w Liverpoolu. Opisany genom zawiera dwa okrągłe chromosomy o 4 105 414 i 486 474 bp, zawierające odpowiednio 3868 i 474 sekwencji kodujących (CDS) dla chromosomów I i II. Cały genom ma średnią zawartość G-C wynoszącą 42% i zawiera dwie kompletne kopie rRNA 5S, 16S i 23S, 37 tRNA, dwa niekodujące RNA (ncRNA) i 42 pseudogeny. Sekwencje dostępne są w bazie danych GenBank pod numerami dostępu CP015217 (chromosom I) i CP015218 (chromosom II). Opisane powyżej wyniki dotyczące identyfikacji nowych serowariantów zostały opublikowane w 3 publikacjach:

- Paiva-Cardoso, M.N., **Arent, Z.**, Gilmore, C.M., Hartskeerl, R., Ellis, W.A. (2012). Altodouro, a new *Leptospira* serovar of the Pomona serogroup isolated from rodents in northern Portugal. *Infection, Genetics and Evolution*,13:211-221.
- Nally JE.,**Arent Z.**, Bayles ZO., Hornsby RL., Gilmore C., Regan S., McDevitt AD., Yearsley J., Fanning , S., McMahon BJ. (2016) Emerging Infectious Disease Implications of Invasive Mammalian Species: The Greater White-Toothed Shrew (*Crocidura russula*) Is Associated With a Novel Serovar of Pathogenic *Leptospira* in Ireland PLoS Negl Trop Dis 10(12): e0005174.
- Nally,J.E., Bayles,D.O., Hurley, D., Fanning, S, McMahon,B.J., **Arent Z.** (2016) Complete Genome Sequence of *Leptospira alstonii* Serovar Room22 Strain GWTS #1. *Genome Announcements* 4,6.

Patogeneza i czynniki wirulencji

Zagadnieniem związanym z patogenezą leptospirozy, którym się zajmowałem w swojej pracy badawczej, była m.in. rola serowariantu Hardjo w zaburzeniach rozrodu u owiec. Reakcje serologiczne świadczące o zakażeniu owiec tym serowariantem odnotowywano w różnych częściach świata. Jednocześnie wiele obserwacji terenowych wskazywało na związek tych zakażeń z problemami rozrodczymi. Potwierdzonym miejscem lokalizacji tych patogenów u zakażonych zwierząt-nosicieli były nerki. Poprzez analogię do leptospirozy bydła, wielu autorów przypuszczało, że również drogi płciowe u owiec, mogą być ważne z punktu widzenia lokalizacji przetrwałej infekcji. Jednak wiele prób izolacji tych bakterii z narządów płciowych u tego gatunku, zarówno podczas infekcji naturalnych czy też w zakażeniach doświadczalnych kończyło się niepowodzeniem. Postęp w udoskonaleniu podłoży do izolacji tych bakterii, jaki dokonał się w naszym laboratorium, ostatecznie umożliwił wyosobnienie Leptospir z dróg płciowych u tego gatunku zwierząt. Do swoich badań wykorzystałem 18 owiec klinicznie zdrowych, ale serododatnich w odczynie aglutynacji mikroskopowej. Próbki nerek, wątroby, mózgu, jajników oraz zeszkobin z błony śluzowej macicy zostały posiane na cztery warianty półpłynnego podłoża wzbogaconego surowicą króliczą oraz na dwa warianty podłoża dwufazowego (z fazą płynną oraz fazą stałą z dodatkiem węgla aktywnego). Wszystkie warianty stosowanych podłoży różniły się rodzajem oraz stężeniem dodatków hamujących wzrost postronnej flory mikrobiologicznej. Hodowle inkubowano w 28-30°Ci w odstępach tygodniowych, sprawdzano mikroskopowo ewentualny wzrost leptospir. Pozytywne wyniki bakteriologiczne uzyskano z nerek 4 owiec oraz z błon śluzowych macic 2 owiec. Wszystkie izolaty zostały serologicznie przypisane do serogrupy Sejroe, natomiast analiza restrykcyjna pozwoliła ocenić je jako serowariant Hardjo typ Bovis. Jest to pierwsza udana izolacja tego serowariantu z układu rozrodczego dorosłych owiec. Do tej pory nie było ewidentnych dowodów na to, że owce mogą pełnić rolę naturalnych żywicieli dla tego serowariantu. Wyniki naszych badań zdecydowanie przemawiają na korzyść stawianej hipotezy. Trwała infekcja dróg rodnych sugeruje, że zakażenia drogą płciową mogą odgrywać ważną rolę w rozprzestrzenianiu się tych infekcji w stadzie. Wyniki tych badań zostały opublikowane w pracy:

- **Arent, Z.**, Frizzell, C., Gilmore, C.M., Mackie, D., Ellis, W. (2013) Isolation of Leptospire from genital tract of sheep. *Veterinary Record*, 173.

Kolejną częścią badań, które wiążą się z patogenezą tej choroby, są badania nad białkiem ClpB. ClpB (Hsp100) wraz z systemem DnaK (Hsp70) tworzy bardzo ważny system opiekuńczy, który uczestniczy w dezagregacji i reaktywacji agregatów białkowych w komórkach. W ciągu ostatnich kilku lat zgromadzono wiele dowodów świadczących o udziale ClpB w patogenezie niektórych chorób bakteryjnych. Wykazano m.in., że ClpB jest niezbędny dla wirulencji takich patogenów bakteryjnych jak: *Mycoplasma pneumoniae*, *Porphyromonas gingivalis*, *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis* i *Leptospira interrogans*. Mutant *clpB* *L. interrogans* charakteryzuje się całkowitą utratą zjadliwości w porównaniu ze szczepem typu dzikiego. W pierwszej pracy dotyczącej tego tematu, w której jestem współautorem i opublikowanej w 2016 roku w *BMC Microbiology* wykazaliśmy, że: (1) ClpB z *L. interrogans* (ClpB_{Li}) może aktywować system immunologiczny gospodarza, o czym świadczy znacząco podwyższony poziom przeciwciał anti-ClpB_{Li} w surowicach zwierząt zakażonych patogennymi szczepami *Leptospira* w porównaniu z kontrolną grupą zwierząt; (2) białko ClpB_{Li} jest produkowane podczas infekcji wywoływanych przez leptospiry; świadczy o tym jego obecność w tkankach nerek zwierząt zakażonych *Leptospira*. Wyniki te potwierdzają udział ClpB w patogenezie leptospirozy. Ponadto w pracy tej została opisana konstrukcja plazmidu, umożliwiającego kontrolowaną produkcję białka ClpB_{Li} oraz metoda oczyszczania rekombinowanego białka z komórek *E. coli*.

W drugiej pracy, dotyczącej tego tematu, opublikowanej w 2017 roku w *PLOS One* zostały przedstawione wyniki analiz biochemicznych i biofizycznych białka ClpB_{Li}. Na ich podstawie stwierdzono, że: (1) ATP γ S indukuje powstawanie heksamerów ClpB_{Li}; (2) ClpB_{Li} wykazuje słabą aktywność ATPazy stymulowaną przez kazeinę i polilizynę; (3) ClpB_{Li} wykazuje aktywność opiekuńczą (dezagregazy) niezależną od systemu Hsp70/40; (4) wiązanie nukleotydu zmienia powinowactwo ClpB_{Li} do zagregowanego substratu. Dodatkowo wykazano brak efektu komplementacji funkcji genu *clpB* bakterii *E. coli* przez *clpB_{Li}*, co sugeruje występowanie różnic międzygatunkowych w funkcjonowaniu białek ClpB.

Opisane powyżej, jak również kolejne badania nad rolą białka ClpB w patogenezie leptospirozy są obecnie prowadzone w ramach pracy doktorskiej pani Joanny Krajewskiej, na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego, w której pełnię rolę promotora pomocniczego. Do tej pory opublikowano dwie prace z tego tematu:

- Krajewska J., **Arent Z.**, Wieckowski D., Zolkiewski M., Kedzierska-Mieszkowska S. (2016) Immunoreactivity of the AAA plus chaperone ClpB from *Leptospira interrogans* with sera from *Leptospira*-infected animals. *BMC Microbiology* 16, 151.
- Krajewska J., Modrak-Wojcik A., **Arent Z.**, Wieckowski D., Zolkiewski M., Bzowska A., Kedzierska-Mieszkowska S. (2017) Characterization of the molecular chaperone ClpB from the pathogenic spirochaete *Leptospira interrogans*. *PLOS One* 12 (7).

Epidemiologia

W ramach swojej pracy naukowej brałem również czynny udział w badaniach nad rozprzestrzenieniem zakażeń *Leptospira* spp u różnych gatunków zwierząt oraz w badaniach związanych z genotypowaniem szczepów wyizolowanych w różnych krajach.

Duża część tych badań dotyczyła psów. Wiadomo, że poziom narażenia tego gatunku na zakażenia *Leptospira*, jak również wywołujące je serogrupy i serowarianty mogą się znacznie różnić w zależności od regionów geograficznych. Na przykład infekcje wywoływane przez serogrupę Grippotyphosa są mniej powszechne w Wielkiej Brytanii niż w Europie kontynentalnej. Nasze badania zostały zainicjowane toczącą się przed kilku laty w Europie dyskusją na temat aktualizacji szczepionek stosowanych u psów. Ponieważ dostępne szczepionki zawierają całe komórki bakteryjne, w związku z tym wykazują skuteczność tylko przeciwko tym serowariantom, które zawarte są w szczepionce. W tej sytuacji rozpoznanie szczepów, na które narażone są psy na danym obszarze geograficznym, jest kluczowe dla skuteczności szczepień.

W Grecji we współpracy z Kliniką Zwierząt Towarzyszących, Wydziału Weterynaryjnego Uniwersytetu Arystotelesa w Tesalonikach, prowadziliśmy badania psów pod kątem ekspozycji tych zwierząt na serogrupy, których nie zawierały komercyjne szczepionki przeciwleptospirozowe, a mianowicie Pomona, Grippotyphosa i Australis. W sumie przebadano 855 surowic psów, które były pacjentami tejże kliniki. Przeciwciała wykryto u 110 (12,9%) zwierząt. Najwyższa seroprevalencja dotyczyła stosunkowo niedawno opisanego nowego serowariantu Altodouro (4,9%) należącego do serogrupy Pomona i wyizolowanego w Portugalii. Ten serowariant wykazał związek ze stwierdzanymi u psów objawami klinicznym. Drugim pod względem częstości reakcji pozytywnych był serowariant Bratislava. Ekspozycję na ten serowariant stwierdzono u 3,4% badanych zwierząt. Na podstawie wyników tych badań

zapropozowano włączenie dodatkowo serowariantów należących do serogrupy Pomona oraz serowariantu Bratislava w szczepionkach dla psów stosowanych w Grecji.

W podobnych badaniach przeprowadzonych w Irlandii przebadano 474 surowic psów. Sześć procent psów trafiających do zakładów leczniczych dla zwierząt na terenie tego kraju, z problemami innymi niż rozpoznana leptospiroza, wykazywało wcześniejszą ekspozycję na patogeny należące do serowariantów Ballum, Australis, Pomona i Sejroe. Jeden nieszczepiony pies podejrzany o leptospirozę wykazywał serokonwersję z antygenem serogrupy Icterohaemorrhagiae. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że ekspozycja psów na serogrupę Ballum powinna być dalej monitorowana, gdyż stwierdzone zakażenia mogą być wskaźnikiem występowania tego serowariantu w środowisku. Dodatkowo, na terenie Irlandii, uzasadnione jest stosowanie wieloważnych szczepionek dla psów, zawierających serowariant Bratislava, oprócz przedstawicieli serogrup Icterohaemorrhagiae i Canicola. Efektem tych badań były publikacje:

- **Arent Z.**, Andrews S., Adamama-Moraitou K., Gilmore C.M., Pardali D., Ellis W.A. (2012) Emergence of novel *Leptospira* serovars: a need for adjusting vaccination policies for dogs? *Epidemiology and Infection*, 141(6):1148-1153.
- Schuller S., **Arent Z.**, Gilmore C., Nally J. (2015) Prevalence of antileptospiral serum antibodies in dogs in Ireland. *Veterinary Record* 177, 5, 126.

Kolejny projekt badawczy z zakresu epidemiologii zakażeń *Leptospira*, w którym brałem udział, przeprowadzono we współpracy z Narodowym Instytutem Chorób Zakaźnych w Tokyو (Japonia). W badaniach tych analizowano zmienność genetyczną szczepów, należących do dwóch gatunków *L. interrogans* i *L. borgpetersenii*. Szczepy te zostały wyizolowane od dzikich zwierząt w czterech wschodnioazjatyckich krajach. Badania wykonano za pomocą metody MLVA. Analizę zmiennej liczby powtórzeń tandemowych 11 loci przeprowadzono na 110 izolatach należących do *L. interrogans* pochodzących z Japonii (79 szczepów, 5 serogrup, od 3 gatunków zwierząt), Filipin (21; 3; 2), Tajwanu (7; 2; 3) i Wietnamu (3; 1; 1). Analizę MLVA wykorzystującą 4 loci dla *L. borgpetersenii* przeprowadzono na 52 izolatach, w tym pochodzących z Japonii (26, 3; 7), Filipin (13; 1; 2) i Tajwanu (13; 1; 3). Szczepy należące *L. interrogans* serogrupy Autumnalis i Hebdomadis były bardziej zróżnicowane pod względem genetycznym niż serogrupy Bataviae, Grippytyphosa, Icterohaemorrhagiae, Pomona lub Pyrogenes. Te pierwsze, z wyjątkiem jednego szczepu Hebdomadis wyizolowano od myszarki japońskiej (*Apodemus speciosus*), drugie natomiast, z wyjątkiem Grippytyphosa, wyizolowano

od szczura wędrownego (*Rattus norvegicus*). *L. borgpetersenii* wyizolowano od co najmniej 11 gatunków zwierząt, podczas gdy *L. interrogans* wyizolowano od pięciu gatunków, co wskazuje na szerszy zakres gospodarzy dla *L. borgpetersenii*. Badania te wykazały, że istnieje zróżnicowanie w zakresie różnorodności genetycznej między różnymi serogrupami *Leptospira*, co związane jest z różnorodnością żywicieli naturalnych oraz różnymi czynnikami środowiskowymi. Z drugiej strony badanie to wykazało również kolonizację pojedynczego genotypu *Leptospira* u wielu gatunków zwierząt. Szczegółowe wyniki tych badań zostały opisane w publikacji:

- Koizumi N., Izumiya H., Mu JJ., **Arent Z.**, Okano S., Nakajima C., Suzuki Y., Muto MM, Tanikawa T, Taylor KR, Komatsu N., Yoshimatsu K., Ha HTT, Ohnishi M. (2015) Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of *Leptospira interrogans* and *Leptospira borgpetersenii* isolated from small feral and wild mammals in East Asia *Infection Genetics and Evolution* 36, 434-440.

Kolejny cykl badań z zakresu epidemiologii dotyczył występowania zakażeń *Leptospira* u dzikich zwierząt na terenie Polski. Prowadzono je we współpracy z Państwowym Instytutem Weterynaryjnym w Puławach. Po raz pierwszy w naszym kraju przeprowadzono szeroko zakrojony przegląd serologiczny dzików (*Sus scrofa*). Próbkę krwi pobrano od 3621 dzików w 314 okręgach łowieckich z 16 województw, w sezonie polowań 2012-2014. Miana przeciwciał przeciwko serowariantom *Leptospira* stwierdzono w 377 próbkach, co stanowiło 10,4%. Odsetek ten był znacznie wyższy w porównaniu do odsetka uzyskanego podczas wcześniejszych badań serologicznych przeprowadzonych na 7112 próbkach surowicy pobranych od świń. Wówczas odsetek zwierząt wykazujących swoiste przeciwciała wynosił 1,2% (73 pozytywne próbki). Relatywnie wysoki wskaźnik infekcji u dzików może stanowić zagrożenie dla myśliwych oraz osób mających kontakt ze środowiskiem leśnym. Dodatkowo stwierdzono, że gęstość populacji dzików w poszczególnych województwach nie odpowiada poziomowi narażenia na kontakt z tymi patogenami.

Przeprowadzono również badania dotyczące częstości występowania zakażeń *Leptospira* u polskich jeleni. W sezonie łowieckim 2014-2015 pobrano 147 próbek krwi od jeleni, saren i danieli, pochodzących z różnych obszarów geograficznych w całej Polsce. Stwierdzono miana przeciwciał dla serowariantów Grippotyphosa, Pomona i Zanoni. Żadna próbka nie dała wyniku pozytywnego dla pozostałych dziewięciu badanych serowariantów. Spośród 147 próbek surowicy tylko 7 było dodatnich, co dało ogólną częstość występowania 4,8% w badanej populacji zwierząt. Niski poziom występowania przeciwciał anty-*Leptospira* wraz z

niską liczbą dodatnich próbek surowicy u jeleni nie wskazuje, aby zwierzęta te stanowiły rezerwuar tych patogenów w naszym kraju. Wyniki powyższych badań opublikowano w dwóch artykułach naukowych:

- Zmudzki J., Jablonski A., Nowak A., Zebek S., **Arent Z.**, Bocian L, Pejsak Z. (2016) First overall report of *Leptospira* infections in wild boars in Poland. *Acta Veterinaria Scandinavica* 58,3.
- Zmudzki J., Jablonski A., **Arent Z.**, Zebek S., Nowak A., Stolarek A., Parzeniecka-Jaworska M. (2016) First report of *Leptospira* infections in red deer, roe deer, and fallow deer in Poland. *Journal of Veterinary Research* 60,3, 257-260.

Diagnostyka Leptospirozy

Praca z obszaru diagnostyki leptospirozy, której jestem współautorem, dotyczyła standaryzacji odczynu hemaglutynacji biernej (OHB) stosowanego w diagnostyce leptospirozy u ludzi i zwierząt. Diagnostyka serologiczna tej choroby oparta jest głównie na odczynie aglutynacji mikroskopowej (OAM). Jest to odczyn serogrupowo swoisty i wykorzystuje żywe szczepy leptospir. Do OHB natomiast, użyliśmy antygenu rodzajowo-swoistego, otrzymanego drogą ekstrakcji dezoksychohanem sodu. Główną zaletą testu było wykrywanie jedynie przeciwciał klasy IgM, co umożliwiła wczesną diagnozę leptospirozy. W naszych badaniach, test ten pozwolił na wykrycie swoistych przeciwciał już od trzeciego dnia choroby. Z drugiej strony, jako odczyn wykrywający jedynie przeciwciała klasy IgM, pozwala na szybką weryfikację znaczenia niskich mian przeciwciał uzyskanym w OAM. Dodatni wynik w OHB przy dodatnim lub ujemnym wyniku w OAM, wskazuje na wczesny proces chorobowy, natomiast ujemny wynik w OHB, przy dodatnim wyniku uzyskanym za pomocą OAM świadczy o postaci przewlekłej. Wyniki tych badań zostały przedstawione w publikacji:

- Kocik T., **Arent. Z.**, Anusz Z., Zdun E. (1998) Odczyn hemaglutynacji biernej w diagnostyce leptospirozy u ludzi i zwierząt. *Życie Weterynaryjne*. 11: 434-438, 1998.

Tematyka badawcza związana z innymi chorobami zakaźnymi

Oprócz tematyki dotyczącej zakażeń *Leptospira* spp. innymi zagadnieniami realizowanymi przez mnie w ciągu mojej pracy zawodowej, były badania dotyczące innych chorób zakaźnych zwierząt. Początkowo moja praca pod kierunkiem profesora Mariana Królaka w Gdańsku

dotyczyła zagadnień związanych z brucelozą oraz standaryzacją metod stosowanych w diagnostyce serologicznej. W tym czasie po raz pierwszy opisaliśmy przypadek zakażenia psa, wywołanego przez jeden z szorstkich szczepów bruceli – *Brucella canis*. Rozpoznanie takiego zakażenia u psa, dało podstawy do przeprowadzenia na szerszą skalę badań przeglądowych zwierząt mięsożernych: psów i lisów hodowlanych, w kierunku takich zakażeń. Wyniki tych badań nie potwierdziły jednak szerszego rozprzestrzenienia się wyżej wymienionych zakażeń w badanej populacji zwierząt.

Kolejne badania dotyczyły standaryzacji odczynu wiązania dopełniacza stosowanego w diagnostyce zakażeń *Brucella ovis* u owiec. Użycie międzynarodowego standardu surowicy przeciwko *B. ovis* pozwoliło przeliczać miana uzyskane w OWD na międzynarodowe jednostki przeciwciał wiążących dopełniacz. Efektem tych prac była instrukcja metodyczna wydana przez Państwowy Instytut Weterynaryjny w Puławach. Standaryzacja metody OWD stosowanej w diagnostyce *B. ovis* pozwoliła kontynuować badania w tym zakresie, czego efektem była moja praca doktorska.

Następną instrukcją metodyczną, również opublikowaną przez PIWet w Puławach, była instrukcja opisująca metody mianowań antygenów i surowic kontrolnych w OWD, stosowanych w diagnostyce różnych chorób zakaźnych u zwierząt.

W kolejnych latach uczestniczyłem w badaniach nad występowaniem zakażeń wirusem enzootycznej białaczki bydła, bydłowym herpes wirusem typu 1 (BHV-1), oraz wirusowej biegunki bydła (BVDV) w województwie pomorskim. Brałem również udział w badaniu żubrów z Białawieskiego Parku Narodowego, u których stwierdzano objawy znacznego wychudzenia, kulawizny oraz zapalenie błony śluzowej żołądki prącia i napletka. U zwierząt tych przeprowadzono badania w kierunku zakażeń wirusami BHV-1, BVDV, pryszczycy (FMDV), oraz parainfluenzy typu 3 (PI-3), a także *Brucella abortus*, *Chlamydomphila abortus*, *Coxiella burnetti* oraz *Leptospira spp.*

Ciekawym doświadczeniem pod względem weterynaryjnym jak i naukowym była również diagnostyka przypadków chorobowych bydła występujących na Kaszubach i przebiegających z upadkami śmiertelnymi, poprzedzonymi objawami nerwowymi. Szczegółowe badania potwierdziły wystąpienie epizoocji wywołanej przez *Listeria monocytogenes*. Wyniki tych badań zostały opublikowane w Medycynie Weterynaryjnej, a autorzy publikacji otrzymali wyróżnienie zespołowe Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych.

Efektom opisanych w tym paragrafie badań były następujące publikacje:

- Kopczewski A., Królak M., **Arent Z.**, Rudnicki K. (1995) Przypadek brucelozy u psa. *Życie Weterynaryjne*. 7:230-231, 1995.
- Kopczewski A., **Arent Z.**, Królak M. (1997) Serologiczne badania lisów i jenotów oraz psów w kierunku brucelozy. *Życie Weterynaryjne*. 8:319-320, 1997.
- Królak M., **Arent Z.** (1995) Zasady mianowania antygenów i dodatnich surowic kontrolnych w standardowej technice odczynu wiązania dopełniacza (OWD), *PIWet, Puławy*.
- Królak M. **Arent Z.** (1996) Standardowa technika odczynu wiązania dopełniacza (OWD) w rozpoznawaniu zakażeń *Brucella ovis* u owiec, *PIWet, Puławy*.
- Salwa A., **Arent Z.**, Kamionowska E., et al. (2002) Sytuacja epizootiologiczna enzoootycznej białaczki bydła na terenie Wybrzeża Gdańskiego w latach 1983-2001.
- Salwa A., Rulka J., **Arent Z.** (2000) The prevalence of the mixed infection of BLV, BHV-1, BVD-MD in dairy herds. *Medycyna Weterynaryjna* 56: 444-446.
- Salwa A., Anusz K., **Arent Z.** (2007) Seroprevalence of selected viral and bacterial pathogens in free-ranging European bison from the Białowieża Primeval Forest (Poland). *Polish Journal of Veterinary Sciences* 10: 19-23.
- Salwa A., Kopczewski A., Borkowska-Opacka B., **Arent Z.** et al. (2007) Epizootic of listeriosis in cows in the Kaszuby region. *Medycyna Weterynaryjna* 63:1579-1582.

6. Podsumowanie dorobku naukowego

Szczegółowy wykaz dorobku naukowego znajduje się w załączniku nr 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

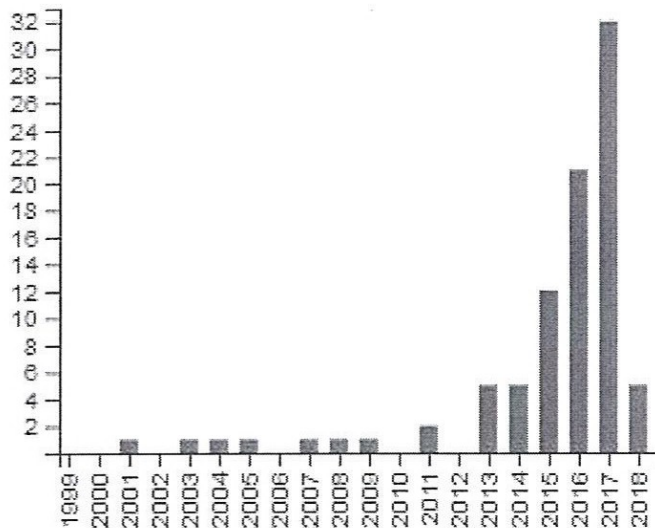
Zestawienie liczby publikacji w poszczególnych czasopismach z listy JCR

Czasopismo	Liczba publikacji
Veterinary Record	4
Infection Genetics and Evolution	3
Medycyna Weterynaryjna	2
Epidemiology and Infection	1
Veterinary Microbiology	1
Plos One	1
Pos Neglected Tropical Diseases	1
BMC Microbiology	1
Acta Veterinaria Scandinavica	1
EcoHealth	1
Polish Journal of Veterinary Sciences	1
Journal of Veterinary Research	1
Liczba publikacji razem	18

Zestawienie dorobku publikacyjnego przed i po uzyskaniu stopnia doktora

Rodzaj publikacji	Przed uzyskanie stopnia doktora		Po uzyskaniu stopnia doktora		Łącznie
Liczba publikacji w czasopismach z listy JCR	0		18		18
Liczba publikacji w czasopismach spoza listy JCR oraz autorstwa w monografiach	5		4		9
Pace naukowe w formie doniesień na międzynarodowe konferencje naukowe	w Polsce	za granicą	w Polsce	za granicą	
	3	0	15	22	40
Sumaryczny współczynnik wpływu (Impact Factor, IF)					33,95
Sumaryczna Liczba punktów MNiSW					498
Liczba cytowań wg. Web of Science					89
- w tym bez autocytowań					54
Indeks Hirscha					6

Liczba cytacji w poszczególnych latach (wg. Web of Science, z dnia 2018.03.15)



Michał Anant

Kraków, 25 Marca 2018