

Załącznik nr 2 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

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



A U T O R E F E R A T

Puławki, 2019

1. Imię i Nazwisko.

Jacek Sroka

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

2005 r. – **doktor nauk weterynaryjnych** - Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Akademia Rolnicza w Lublinie, (Tytuł rozprawy doktorskiej: „Badania nad występowaniem *Toxoplasma gondii* u zwierząt hodowlanych i dzikich z terenu województwa lubelskiego w aspekcie zagrożenia zdrowia ludności wiejskiej”)

1994 r. - **lekarz weterynarii** - Akademia Rolnicza w Lublinie

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

2007 – **adiunkt** – Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

2006 – **adiunkt** Zakład Biologicznych Szkodliwości Zawodowych (obecna nazwa: Zakład Biologicznych Szkodliwości Zdrowotnych i Parazytologii), Instytut Medycyny Wsi w Lublinie,

1994 – **asystent** Zakład Chorób Odzwierzęcych, Instytut Medycyny Wsi w Lublinie

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,

„Ocena potencjalnych źródeł zarażenia *Toxoplasma gondii* w Polsce w aspekcie zagrożenia zdrowia ludzi”

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

H-1: Sroka J., Karamon J., Cencek T., Dutkiewicz J.: Preliminary assessment of the usefulness of cELISA test for screening of pig and cattle populations for the presence of antibodies against *Toxoplasma gondii*. Ann Agric Environ Med. 2011, 18, 335-339.

IF2011=2,311; MNiSW₂₀₁₁=25pkt.; liczba cytowań (WoS Core Collection) – 8

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części badań laboratoryjnych, opracowaniu wyników i przygotowaniu pracy do druku. Mój udział procentowy szacuję na: 85%

H-2 Sroka J., Cencek T., Ziomko I., Karamon J., Zwoliński J.: Preliminary assessment of ELISA, MAT and LAT for detecting *Toxoplasma gondii* antibodies in pigs. Bull Vet Inst Pulawy. 2008, 52, 4, 545-549.

IF₂₀₀₈=0,337; MNiSW₂₀₀₈=15pkt.; liczba cytowań (WoS Core Collection) – 7

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

H-3: Sroka J., Karamon J., Dutkiewicz J., Wójcik-Fatla A., Cencek T.: Optimization of flotation, DNA extraction and PCR methods for detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in cat faeces. Ann Agric Environ Med. 2018, 25, 680–685.

DOI: <https://doi.org/10.26444/aaem/97402>

IF₂₀₁₈= 1.116; MNiSW₂₀₁₈=30 pkt.; liczba cytowań (WoS Core Collection) – 0

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

H-4: Sroka J., Karamon J., Dutkiewicz J., Wójcik Fatla A., Zając V., Cencek T. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cats in southwestern Poland. Ann Agric Environ Med. 2018, 25, 576-580. DOI: <https://doi.org/10.26444/aaem/94675>

IF₂₀₁₈= 1.116; MNiSW₂₀₁₈=30 pkt.; liczba cytowań (WoS Core Collection) – 0

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części badań laboratoryjnych, opracowaniu wyników i przygotowaniu pracy do druku. Mój udział procentowy szacuję na: 85%

H-5: Sroka J., Wójcik-Fatla A., Szymańska J., Dutkiewicz J., Zając V., Zwoliński J. Occurrence of *Toxoplasma gondii* infection in people and animals from rural environment of Lublin region – estimate of potential role of water as a source of infection. Ann Agric Environ Med. 2010, 17, 125-132.

IF₂₀₁₀=1,062; MNiSW₂₀₁₀=27pkt.; liczba cytowań (WoS Core Collection) – 36

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

H-6: Sroka J., Bilska-Zając E., Wójcik-Fatla A., Zając V., Dutkiewicz J., Karamon J., Piotrowska W., Cencek T.: Detection and molecular characteristics of *Toxoplasma gondii* DNA in retail raw meat products in Poland. Foodborne Pathog Dis. 2019, 16, 3, 195-204.

DOI: 10.1089/fpd.2018.2537

IF₂₀₁₈= 2.476; MNiSW₂₀₁₈=30 pkt.; liczba cytowań (WoS Core Collection) – 0

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części badań laboratoryjnych, opracowaniu wyników i przygotowaniu pracy do druku. Mój udział procentowy szacuję na: 65%

H-7: Sroka J., Kusyk P., Bilska-Zajac E., Karamon J., Dutkiewicz J., Wójcik-Fatla A., Zajac V., Stojcki K., Różycki M., Cencek T.: Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in goats from the south-west region of Poland and the detection of *T. gondii* DNA in goat milk. *Folia Parasitol.* 64: 023 (2017)

DOI: 10.14411/fp.2017.023

IF₂₀₁₇=1,505; MNiSW₂₀₁₇=20 pkt.; liczba cytowań (WoS Core Collection) – 3

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części badań laboratoryjnych, opracowaniu wyników i przygotowaniu pracy do druku. Mój udział procentowy szacuję na: 73%

H-8: Sroka J., Wójcik-Fatla A., Zwoliński J., Zajac V., Sawczuk M., Dutkiewicz J. Preliminary study on the occurrence of *Toxoplasma gondii* in *Ixodes ricinus* ticks from north-western Poland with the use of PCR. *Ann Agric Environ Med.* 2008, 15, 333-338.

IF₂₀₀₈=1,443; MNiSW₂₀₀₈=15pkt.; liczba cytowań (WoS Core Collection) – 9

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

H-9: Wójcik-Fatla A., Sroka J., Zajac V., Sawczyn A., Cisak E., Dutkiewicz J.: *Toxoplasma gondii* (Nicolle et Manceaux, 1908) detected in *Dermacentor reticulatus* (Fabricius) (Ixodidae). *Folia Parasitol* 2015, 62:055 (Open access)

DOI: 10.14411/fp.2015.055)

IF₂₀₁₅=1,271; MNiSW₂₀₁₅=20 pkt.; liczba cytowań (WoS Core Collection) – 1

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

Łączny IF publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: 12,637

Łączna liczba punktów MNiSW/KBN za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego: 212

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

Zarażenie pasożytniczym pierwotniakiem *Toxoplasma gondii* ciągle stanowi aktualny problem zdrowotny (Torgerson i Mastroiacovo, 2013; WHO, 2015). Czynnikiem etiologicznym toksoplazmozy jest pasożytniczy pierwotniak *Toxoplasma gondii*, powodujący zarażenia niemal u wszystkich gatunków zwierząt ciepłokrwistych na świecie, a także u człowieka. Kot domowy (i inne kotowate), u którego w jelicie cienkim dochodzi do rozmnażania płciowego *T. gondii* i powstania form inwazyjnych – oocyst, jest żywicielem ostatecznym pasożyta i odgrywa ważną rolę w epidemiologii toksoplazmozy. Oocysty wydalone są wraz z kałem kotów do środowiska, gdzie w stanie żywym mogą przetrwać miesiące, a nawet lata. Ze względu na zwykle jednorazowy oraz krótki okres wydalania oocyst przez zarażone koty (1-3 tygodni), możliwość wykrycia oocyst w kale kota podczas jednorazowego badania jest niewielka. Innymi postaciami pasożyta są jego formy wegetatywne: tachyzoity i bradyzoity. Tachyzoity są to szybko dzielące komórki pasożyta, charakterystyczne dla ostrej fazy inwazji. Są kształtu sierpowatego, o wymiarach $2-4 \times 4-7 \mu\text{m}$, z jednym końcem zaostrozonym i drugim zaokrąglonym oraz centralnie umieszczonym jądrem. Na przednim biegunie znajduje się tzw. aparat apikalny, umożliwiający aktywne wnikanie tachyzoitu do komórki żywiciela. Odpowiedź obronna organizmu na zarażenie *T. gondii* następuje głównie na drodze komórkowej i istotną rolę odgrywają w niej makrofagi, limfocyty CD4^+ , CD8^+ , cytokiny oraz komórki NK. W tkankach żywicieli pośrednich (zwierząt ciepłokrwistych i człowieka) pasożyt rozmnaża się na drodze bezpłciowej (endodyogenii). Swoiste przeciwciała, będące wynikiem odpowiedzi humoralnej organizmu mogą być wykrywane w surowicy przez wiele lat. Podczas przewlekłej fazy inwazji w organizmie żywiciela powstają cysty, o wielkości od ok. 20 do 200 μm , które mogą być wypełnione setkami bradyzoitów, komórek morfologicznie zbliżonych do tachyzoitów. Najczęściej, cysty lokalizują się w tkankach i narządach dobrze ukrwionych (mięśniach szkieletowych, sercu, języku, przeponie, narządach wewnętrznych). Cysty mogą być również obecne w mózgu i narządzie wzroku i poprzez mechaniczne oddziaływanie, powodować dysfunkcję tych narządów. W wyniku obniżenia sił odpornościowych organizmu może dochodzić do reinwazji – uwalniania się bradyzoitów z cyst, ich przekształcania się w szybko namnażające się tachyzoity, które z kolei atakują kolejne komórki (Dubey & Beattie, 1988; Tenter i wsp., 2000; Dawson 2005).

Pod względem genetycznym, *Toxoplasma gondii* jest gatunkiem polimorficznym i wykazuje strukturę klonalną. Dotychczasowe dane wskazują na występowanie w Europie i

Ameryce Północnej trzech archetypowych linii klonalnych *T. gondii* (I, II, III), różniących się patogennością (Howe i Sibley, 1995; Ajzenberg i wsp., 2002; Ajzenberg, 2010). Zarażenia u ludzi wywołane typem I najczęściej dotyczą inwazji nabytych i mają zwykle ostry przebieg kliniczny, ten typ klonalny często izolowany jest w przypadkach toksoplazmozy ocznej. Typ II jest w warunkach europejskich częstą przyczyną postaci wrodzonej toksoplazmozy u ludzi, jest on również najczęściej izolowany od zwierząt. Typ III izolowano głównie ze środowiska. Jest on rzadką przyczyną przypadków klinicznych toksoplazmozy u ludzi w Europie. Jednocześnie w innych rejonach świata (m.in. Ameryka Płd.), znaczna część izolowanych szczepów należy do typu I i III oraz izolowane są szczepy atypowe, a genetyczna struktura izolatów od ludzi często koresponduje z profilem genetycznym pasożyta izolowanym od zwierząt lub z elementów środowiska (Lehmann i wsp., 2006; Pena i wsp., 2008; Khan i wsp., 2011). Jednak zależność między odmianą klonalną pasożyta a charakterem zmian patologicznych wywołanych inwazją u człowieka nie jest do końca poznana i jej określenie wymaga dalszych badań (Fuentes i wsp., 2001, Robert-Gangneux & Darde, 2012).

Stopień zarażenia *T. gondii* ludzi na świecie, oceniany na podstawie wyników badań serologicznych, jest zróżnicowany i zależy m.in. od wieku badanych osób, ich zwyczajów żywieniowych, częstości kontaktu z potencjalnymi źródłami zarażenia, przestrzegania higieny. Odsetki wyników seropozytywnych różnią się również w zależności od rejonu badań, warunków klimatycznych i socjo-ekonomicznych i wynoszą od kilku do kilkudziesięciu % (Tenter i wsp., 2000). W Polsce wartości te ocenia się średnio na 40-60%, w zależności od grupy badanej (Nowakowska i wsp., 2006; Nowakowska i wsp., 2014; Holec-Gasior i wsp., 2008; Holec-Gasior i Kur, 2009). Toksoplazmoza u ludzi ma przeważnie przebieg bezobjawowy. W postaci nabytej toksoplazmozy, u około 5-20% osób zarażonych obserwuje się powiększenie węzłów chłonnych z towarzyszącymi objawami grypopodobnymi. Jednak u osób z osłabioną odpornością zmiany chorobowe mogą dotyczyć wielu narządów wewnętrznych i tkanek (m. in. płuc, serca, wątroby, mózgu, opon mózgowo-rdzeniowych). Czasami toksoplazmoza może mieć charakter uogólniony (np. u chorych na AIDS). Szczególnie groźne jest pierwotne zarażenie *T. gondii* u kobiety ciężarnej, wskutek czego może dojść do transmisji pasożytów do płodu i wystąpienia toksoplazmozy wrodzonej lub poronienia (Dubey i Beatty, 1988; Tenter i wsp., 2000). Częstość występowania toksoplazmozy wrodzonej w Europie ocenia się na 1-6 przypadków na 1000 urodzeń, a w Polsce 1-2 na 1000 urodzeń (Paul, 2001). U zarażonych płodów mogą wystąpić zmiany patologiczne

m.in. w postaci wodogłowia, zwapnień wewnątrzczaszkowych, wodobrzusza oraz stanów zapalnych narządu wzroku. W niektórych przypadkach objawy toksoplazmozy wrodzonej mogą ujawnić się nawet po kilku lub kilkunastu latach w postaci uszkodzenia narządu wzroku, słuchu lub zmian psychicznych (Dubey, 2008). Przypadki toksoplazmozy wrodzonej podlegają w Polsce obowiązkowi rejestracji.

Do zarażenia człowieka *T. gondii* dochodzi głównie na drodze pokarmowej przez spożycie surowego lub poddanego niedostatecznej obróbce termicznej mięsa, zawierającego cysty tkankowe pierwotniaka. W warunkach europejskich, najczęstszym źródłem zarażenia są surowe tkanki zwierząt rzeźnych, w szczególności świń (van der Giessen i wsp., 2007; Kijlstra i wsp., 2009; Limon i wsp., 2017). Wyniki badań wskazują również na zagrożenia inwazją *T. gondii* związaną z konsumpcją surowej wołowiny i jagnięciny (Jones i wsp., 2009). Ważnym źródłem zarażenia, zwłaszcza dla myśliwych, ich rodzin oraz konsumentów dziczyzny mogą być tkanki dzików i jeleniowatych (Tenter i wsp., 2000; Brandon-Mong i wsp., 2015). Zarażenie *T. gondii* stwierdza się również u drobiu, jednak ze względu na stosowane procesy technologiczne (mrożenie) oraz zwyczaje żywieniowe (gotowanie, pieczenie), drób nie jest uznawany jako źródło inwazji *T. gondii* dla ludzi w Europie (Tenter i wsp., 2000). Innym źródłem inwazji dla człowieka może być żywność, woda lub gleba zanieczyszczone oocystami wydalانymi z kałem przez zarażonego kota (Kijlstra i wsp., 2004; Lass i wsp., 2012; EFSA, 2007). Również surowe mleko (lub produkty z mleka) pochodzące od zarażonych kóz i owiec mogą być źródłem pasożyta (Mancianti i wsp. 2013; Dubey i wsp. 2014). Osoby mające zawodowy kontakt z surowymi tkankami, wydalınami i wydzielinami zwierząt (m.in. myśliwi, pracownicy przemysłu mięsnego, hodowcy zwierząt) są szczególnie narażone na kontakt z *T. gondii* (Sroka i wsp. 2003a; Dias i wsp. 2005). Dotychczasowe badania prowadzone w Polsce wykazywały również znaczne narażenie ludności wiejskiej na kontakt z pasożytem, w tym środowisku stwierdzano również przypadki toksoplazmozy rodzinno-środowiskowej (Kocięcka i wsp. 1998; Sroka, 2001; Sroka i wsp. 2006; Sroka i Szymańska, 2012).

Rezerwuarem pasożyta i jego pierwotnym źródłem w środowisku są koty (Tenter i wsp., 2000). U kotów inwazja *T. gondii* przebiega zwykle bezobjawowo, postać kliniczna jeśli występuje, dotyczy zwykle młodych kociąt i objawia się m.in. w postaci gorączki, anoreksji, zapalenia oczu, zaburzeń gastrycznych i neurologicznych (Dubey, 1979). Jak wynika z literatury, większość kotów ulega zarażeniu cystami pasożyta obecnymi w surowych tkankach (np. upolowane zwierzęta lub. odpady rzeźniane). Częściej stwierdzane

są przypadki zarażeń *T. gondii* wśród kotów bezpańskich lub dziczyńskich oraz mających możliwość przebywania poza domem (Dubey, 2010).

Źródłem pasożyta dla zwierząt gospodarskich może być pasza, pastwisko, woda i gleba, zanieczyszczone oocystami. Dla zwierząt mięsożernych źródłem pasożyta mogą być surowe tkanki zwierząt, w których obecne są cysty tkankowe pierwotniaka. Inwazja *T. gondii* u zwierząt, przebiega zwykle bezobjawowo, a stopień zarażenia, oceniany w oparciu o wyniki badań serologicznych, wykazuje znaczne zróżnicowanie w zależności od rejonu geograficznego, gatunku, typu hodowli i warunków zoohigienicznych. Oprócz strat ekonomicznych w produkcji zwierzęcej, związanych przede wszystkim z zaburzeniami w rozrodzie, występowanie zarażenia *T. gondii* u zwierząt należy rozpatrywać głównie w aspekcie zagrożenia zdrowia ludzi (Tenter i wsp. 2000).

Istotną rolę w utrzymywaniu się *T. gondii* w środowisku odgrywają również zwierzęta wolno żyjące, w tym: dziki, jeleniowate, lisy, a także drobne gryzonie. Źródłem zarażenia dla tych zwierząt może być pokarm, woda, gleba zanieczyszczone oocystami pasożyta. Wolno żyjące zwierzęta mięsożerne i wszystkożerne mogą zarażać się zjadając drobne gryzonie, ptaki, zwłoki padłych lub upolowanych zwierząt, zawierające cysty pasożyta (Tenter i wsp., 2000).

Określenie ekstensywności inwazji *T. gondii* w populacjach zwierząt rzeźnych oraz ocena stopnia zanieczyszczenia pasożytem surowych produktów pochodzenia zwierzęcego ma istotne znaczenie w aspekcie potencjalnego zagrożenia dla zdrowia człowieka. Również wiedza na temat skali zarażenia *T. gondii* populacji kotów, może sprzyjać podejmowaniu ewentualnych działań profilaktycznych np. na ograniczeniu dostępu kotów do pomieszczeń dla zwierząt rzeźnych (Kijstra i wsp., 2009).

Jak się wydaje, nadal brak jest wystarczających informacji nt. najczęstszych źródeł zarażenia *T. gondii* dla ludzi w Polsce. Do oceny stopnia zarażenia *T. gondii* u zwierząt wykorzystywanych jest szereg technik serologicznych, które pozwalają na wykrywanie swoistych przeciwciał anty *T. gondii*, m.in. odczyn aglutynacji bezpośredniej (DAT) (inna nazwa - zmodyfikowany odczyn aglutynacji (MAT)), odczyn immunofluorescencji pośredniej (IFAT) oraz różne odmiany testu ELISA. W diagnostyce molekularnej (PCR) w kierunku *T. gondii*, najczęściej wykorzystuje się amplifikację genu B1 lub 529-bp RE. Stosowane są różne odmiany PCR, m.in. RFLP, nested i Real-time (Robert-Gangneux i Darde, 2012). Zastosowanie PCR-RFLP (lub multilocus PCR) umożliwia genetyczną analizę różnych szczepów *T. gondii* pod względem ich przynależności do określonego typu

klonalnego, który warunkuje zjadliwość pasożyta. W celu określenia profilu genetycznego wykorzystuje się szereg markerów genetycznych, m.in. SAG1, SAG2, SAG3, GRA6 i BTUB (Su i wsp., 2010). Analiza molekularna szczepów *T. gondii* izolowanych od zwierząt, ludzi lub ze środowiska, prowadzona jest w wielu krajach na świecie, jednak w Polsce, jak dotychczas, niewiele jest podobnych badań. Oprócz znaczenia poznawczego (ocena dróg krążenia pasożyta w środowisku), taka analiza może mieć wymiar praktyczny, np. przy postępowaniu terapeutycznym w przypadkach klinicznych toksoplazmozy u ludzi. Ograniczona liczba badań prowadzonych w Polsce i mających na celu detekcję oraz charakterystykę molekularną *T. gondii*, może wynikać z ich znacznej kosztochłonności oraz ograniczeń sprzętowych. Należy mieć także na uwadze, że do w/w celów badawczych niezbędne jest wykorzystanie zwalidowanych technik badawczych, charakteryzujących się dobrą czułością i specyficznością.

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

I. Adaptacja oraz ocena przydatności wybranych technik do diagnostyki

Toxoplasma gondii

II. Ocena występowania zarażenia *T. gondii* u wybranych gatunków zwierząt mających potencjalne znaczenie w epidemiologii toksoplazmozy u ludzi w Polsce

III. Ocena zanieczyszczenia *T. gondii* wybranych produktów pochodzenia zwierzęcego wraz charakterystyką molekularną pasożyta

IV. Występowanie *T. gondii* w wybranych elementach środowiska

Omówienie przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników

Ad I Adaptacja oraz ocena przydatności wybranych technik do diagnostyki

Toxoplasma gondii

- a) Porównanie skuteczności wybranych technik serologicznych w diagnostyce toksoplazmozy u zwierząt.** Badania serologiczne są najczęściej stosowanymi technikami w diagnostyce toksoplazmozy i znajdują szczególne zastosowanie m.in. w

ocenie ekstensywności inwazji w danej populacji ludzi lub zwierząt. Ze względu na wykazaną doświadczalnie u świń, istotną korelację między obecnością swoistych przeciwciał i detekcją żywych pasożytów w ich tkankach, badania serologiczne świń mogą mieć szczególną wartość w aspekcie szacowania ryzyka inwazji dla konsumentów wieprzowiny. (Dubey, 1988; Dubey i wsp., 1995) Jednak poszczególne techniki serologiczne mają swoje ograniczenia np. w postaci subiektywności odczytu wyników (DAT) lub możliwości bieżącego zastosowania tylko dla określonego gatunku zwierząt (ELISA, IFAT).

Stąd celem badań własnych było opracowanie testu, uniwersalnego dla badania różnych gatunków zwierząt, mogącego mieć zastosowanie zwłaszcza do badań skriningowych. Wyniki pracy zostały przedstawione w publikacji **H-1 [Sroka i wsp. *Preliminary assessment of the usefulness of cELISA test for screening of pig and cattle populations for the presence of antibodies against Toxoplasma gondii. Ann Agric Environ Med. 2011, 18, 335-339*]**. Technika spełniającą powyższe wymagania jest nowo opracowany kompetycyjny test ELISA (cELISA). Zasada testu opiera się na „rywalizacji” o miejsce przyczepu na antygenie *T. gondii* opłaszczonym na płytce, między przeciwciałami anty *T. gondii* obecnymi w surowicy diagnozowanej i dodawanymi dodatkowo, przeciwciałami monoklonalnymi. Optymalizację i walidację testu przeprowadzono z użyciem dodatnich i ujemnych surowic różnych gatunków zwierząt gospodarskich, w tym świń i bydła, wyselekcjonowanych na podstawie wyników badań w innych testach (IFAT, DAT, LAT). Proces walidacji wykazał wyższą czułość i specyficzność cELISA w badaniu surowic świń (odpowiednio: 88,1% i 94,5%) niż bydła (odpowiednio: 76,9% i 93,4%). W badaniu porównawczym surowic świń przy użyciu testów MAT i cELISA, stwierdzono istotną korelację między mianami surowic dodatnich w MAT i wartościami indeksu w cELISA ($R=0,83$, $p<0,001$). W odniesieniu do surowic bydlęcych powyższa korelacja była nieco słabiej wyrażona ($R=0,61$, $p<0,001$). Niższa czułość i specyficzność cELISA w odniesieniu do surowic bydła może częściowo wynikać z obecności w surowicy tego gatunku zwierząt tzw. przeciwciał naturalnych, które mogą zaburzać prawidłowość wyników badań serologicznych. Nowo opracowany test cELISA, może znaleźć uniwersalne zastosowanie do badań różnych gatunków zwierząt. Dzięki możliwości wykrywania wszystkich klas przeciwciał anty *T. gondii* (IgM, IgG, IgA, IgE) test cELISA może wykazywać wyższą czułość w porównaniu do dotychczas stosowanego w Zakładzie testu DAT, wykrywającego jedynie p-ciała klasy IgG. Uzyskane wyniki wskazują na

szczególną przydatność testu cELISA do badania surowic świń i w nieco mniejszym stopniu surowic bydła. Badania własne wykazały również szczególną przydatność cELISA w badaniu surowic takich gatunków zwierząt, jak koty oraz owce (dane niepublikowane).

W ramach kolejnych etapów pracy, przeprowadzono badania porównawcze nad przydatnością dwóch komercyjnych testów serologicznych: testu aglutynacji bezpośredniej (MAT) oraz testu aglutynacji lateksowej (LAT), a także własnego, nowo opracowanego testu pośredniego ELISA w diagnostyce toksoplazmozy u świń (wyniki przedstawiono w publikacji **H-2 [Sroka i wsp. Preliminary assessment of ELISA, MAT and LAT for detecting *Toxoplasma gondii* antibodies in pigs. Bull Vet Inst Pulawy. 2008, 52, 4, 545-549]**). Jako testu referencyjnego użyto testu immunofluorescencji pośredniej (IFAT). Najwyższą specyficznością, w porównaniu do testu referencyjnego (IFAT) wykazał się MAT (100,0%), a największą czułością test ELISA (88,9%). LAT wykazywał najniższą specyficzność i czułość, odpowiednio na poziomie 91,4% i 47,2%. Analiza statystyczna wykazała najwyższą zgodność jakościową między wynikami uzyskanymi w testach IFAT, ELISA i MAT (Spearman's rank correlation coefficient (R) i Cohen's Kappa statistic (K)>0,8), natomiast niską zgodność uzyskano między wynikami LAT i wynikami uzyskanymi w pozostałych testach (wartości R i K<0,6). Przeprowadzone badania potwierdziły przydatność testów ELISA i MAT, do wykrywania przeciwciał anty *T. gondii* u świń. Ponieważ ELISA i MAT umożliwiają wykrywanie wyłącznie przeciwciał klasy IgG *T. gondii*, podczas gdy LAT umożliwia wykrywanie przeciwciał obu klas - IgG i IgM, hipotetycznie LAT powinien być optymalnym testem do badań skriningowych. Jednak wyniki badań własnych wykazały, że LAT nie spełniał odpowiednich wymagań w zakresie wykrywania przeciwciał *Toxoplasma* u świń. Nowo opracowany test pośredni ELISA może być użyteczny m.in. w badaniach skriningowych populacji świń.

b) Optymalizacja technik PCR do wykrywania oocyst *T. gondii* w kale. Ze względu na morfologiczne i morfometryczne podobieństwo oocyst *T. gondii* do oocyst innych kokcydiów np. *Hammondia hammondi*, *Cystoisospora* spp., *Sarcocystis* spp. badanie mikroskopowe nie zawsze zapewnia właściwą identyfikację pasożyta, co stwarza możliwość uzyskiwania wyników fałszywie dodatnich (Barutzki i Schaper, 2003; Chemoh i wsp., 2016). W przypadkach niskiej intensywności inwazji *T. gondii*, badanie mikroskopowe, ze względu na swoją niską czułość, może dawać wyniki fałszywie

ujemne. Stąd badanie molekularne kału, jako dodatkowe, może być przydatne dla potwierdzenia wyniku. W literaturze istnieje szereg protokołów badań PCR z użyciem różnych markerów genetycznych dla wykrywania *T. gondii* w kale kotów. Jednak najwyższą czułość wykazują techniki z wykorzystaniem fragmentów sekwencji konserwatywnych genów DNA, mających dużą liczbę powtórzeń w genomie, głównie genu B1 oraz 529 repeated element (529 RE) (Salant i wsp., 2010; Chemoh i wsp., 2016). Stąd celem badań własnych była ocena skuteczności różnych technik PCR z użyciem genu B1 w wykrywaniu DNA *T. gondii*, jak również ocena wpływu wybranych metod koncentracji oocyst, ekstrakcji DNA na skuteczność detekcji DNA pasożyta w PCR, w kontekście opracowania skutecznych i użytecznych w praktyce laboratoryjnej procedur. Wyniki badań przedstawiono w publikacji **H-3 [Sroka i wsp. *Optimization of flotation, DNA extraction and PCR methods for detection of Toxoplasma gondii* oocysts in cat faeces. *Ann Agric Environ Med.* 2018, 25, 680–685]**. Badano efektywność metody flotacji z wykorzystaniem różnych roztworów flotujących, jak również efektywność ekstrakcji DNA z użyciem różnych komercyjnych zestawów do izolacji DNA, a także porównywano skuteczność detekcji DNA pasożyta stosując kilka odmian techniki PCR. Jak wykazano, skuteczny odzysk oocyst z domieszkowanych nimi próbek kału oraz brak negatywnego wpływu na strukturę oocyst zapewniało użycie NaNO₃ jako roztworu flotującego. Wykorzystanie NaNO₃ miało również korzystny wpływ na wydajność ekstrakcji DNA i amplifikacji w PCR. Do ekstrakcji DNA z oocyst wymagana jest ich wcześniejsza dezintegracja, której dokonano poprzez naprzemienne oddziaływanie niskiej i wysokiej temperatury (umieszczenie próbek w ciekłym azocie, a następnie w łaźni wodnej o temp. 60°C).

W badaniu Real time PCR (RT) próbek wody domieszkowanych różnymi liczebnościami oocyst (250, 100, 50, 20, 10, 5, 2, 1) w którym DNA ekstrahowano przy pomocy zestawu komercyjnego DNeasy Blood and Tissue Kit (K1), granica wykrywalności (LD) wynosiła 1 oocysta / próbkę. Badanie przy użyciu nested PCR wykazało podobną wartość LD - 2 oocysty / na próbkę, jednakże otrzymano również wyniki ujemne dla pośrednich liczebności oocyst w próbce. W badaniu próbek wody domieszkowanych oocystami, w których DNA wyizolowano za pomocą zestawu Qiaamp DNA Stool Mini Kit (K2) LD zostało określone na 50 oocyst / 250 mg próbki kału i było wyższe niż przy użyciu zestawu K1. Z kolei, wyniki RT dla próbek kału domieszkowanych oocystami wykazały większe różnice. Porównując skuteczność

dwóch zestawów do ekstrakcji DNA, stwierdzono wyższą czułość PCR w badaniu próbek kału, z których DNA ekstrahowano przy użyciu zestawu K2 niż K1. Dla zestawu K2 LD określono na 1 (odmiana RT z sondą TaqMan) i 50 (odmiana RT z fluorogenem EvaGreen) oocyst/na próbkę, natomiast dla zestawu K1 LD wyniosło 250 oocyst/na próbkę. Jednak stosując zestaw K2 uzyskano również ujemne wyniki dla pośrednich liczebności oocyst (50, 20, 10). W nested PCR, dla próbek kału izolowanych obydwojema zestawami do ekstrakcji DNA (K1 i K2), LD określono odpowiednio na 5 i 50 oocyst/250 mg kału. Badania własne potwierdziły opinię, że inhibitory obecne w kale znacząco zmniejszają czułość reakcji PCR, szczególnie w wariancie RT. Stąd dla zapewnienia właściwej czułości PCR w badaniu próbek kału, przy wyborze odpowiedniej metody ekstrakcji DNA powinno uwzględniać się możliwość eliminacji inhibitorów (Uwatoko i wsp. 1996). Wyniki własne uzyskane z użyciem RT dla próbek oczyszczonych z inhibitorów za pomocą zestawu Qiaamp DNA Stool Mini Kit (K2), mogą potwierdzić tę opinię. Jednocześnie jednak, proces eliminacji inhibitorów może również zmniejszyć ilość izolowanego DNA, co również potwierdziły wyniki testu RT dla próbek wody domieszkowanych oocystami, gdzie wartości Ct dla próbek DNA izolowanych zestawem K2 były wyższe niż dla próbek izolowanych bez dodatkowego etapu eliminacji inhibitorów (zestaw K1).

Podsumowując, wyniki badań własnych wykazały, że skutecznymi metodami wykrywania *T. gondii* w kale kocim mogą być: flotacja próbki kału z użyciem NaNO_3 wraz wirowaniem, ekstrakcja DNA z etapem eliminacji inhibitorów PCR (zestaw K2), a także test Real time PCR, w którym amplifikowany jest fragment genu B1. Metody te wydają się odpowiednie zarówno do badań skriningowych jak i do rutynowej diagnostyki.

Ad. II Ocena występowania zarażenia *T. gondii* u wybranych gatunków zwierząt mających znaczenie w epidemiologii toksoplazmozy u ludzi w Polsce

- a) Badania kotów.** Celem badań była ocena stopnia zarażenia *T. gondii* populacji kotów w wybranych rejonach kraju. Ekstensywność inwazji *T. gondii* w danej populacji kotów zależy m.in. od ich wieku, rodzaju pożywienia, środowiska bytowania (koty wolno żyjące / utrzymywane w domu, wieś / miasto). Dotychczasowe, nieliczne badania kotów w Polsce w kierunku toksoplazmozy,

obejmowały m.in. teren Olsztyna i Poznania, gdzie stwierdzano nawet powyżej 70% wyników seropozytywnych (Wąsiatycz 1998; Michalski i Platt-Samoraj, 2004; Michalski i wsp., 2010). Brak jest jednocześnie danych z innych rejonów Polski. Badania własne dotyczyły populacji kotów z Polski południowo-zachodniej (woj. śląskie) (publikacja **H-4 [Sroka i wsp. *Prevalence of Toxoplasma gondii infection in cats in southwestern Poland. Ann Agric Environ Med. 2018, 25, 576-580*]**) oraz wschodniej (woj. lubelskie) (publikacja **H-5 [Sroka i wsp. *Occurrence of Toxoplasma gondii infection in people and animals from rural environment of Lublin region – estimate of potential role of water as a source of infection. Ann Agric Environ Med. 2010, 17, 125-132*]**). W badaniach serologicznych kotów z woj. śląskiego wykorzystano test immunofluorescencji pośredniej (IFAT) do wykrywania przeciwciał anty *T. gondii* klasy IgG i IgM. Wykrywanie obydwu klas przeciwciał pozwoliło na przybliżone określenie fazy zarażenia, a tym samym orientacyjnego czasu wydalania oocyst. Populację kotów z woj. lubelskiego badano na obecność p-ciał anty *T. gondii* klasy IgG przy pomocy DAT (Toxo-Screen DA, bioMérieux).

Wyniki przeprowadzonych badań serologicznych wskazują na wysoką seroprewalencję w kierunku *T. gondii* zarówno wśród kotów z woj. śląskiego (68,8%) jak i woj. lubelskiego (75,0%), co pośrednio może wskazywać na znaczne zanieczyszczenie środowiska oocystami na tych obszarach. U 23,1% kotów z woj. śląskiego (głównie młodych), stwierdzono również przeciwciała klasy IgM, co wskazywałoby na świeżą inwazję i możliwość wydalania oocyst w nieodległym czasie. W ogólnym zestawieniu wyników badań kotów z woj. śląskiego, stwierdzono istotnie większą częstość występowania przeciwciał anty *T. gondii* u kotów starszych (>1 rok) (83,5%) niż u młodszych (48,3%) ($p < 0,05$) oraz u samic (74,1%) w porównaniu do samców (58,8%) ($p < 0,05$), a także u kotów przebywających poza domem niż przebywających jedynie w domu (69,7% vs. 16,7%) ($p < 0,01$). Warto również zauważyć, że przeszło połowa kotów z obydwu terenów badań, reagujących seropozytywnie, wykazywała wysokie (>1620 , woj. lubelskie) i bardzo wysokie ($\geq 4,000$, woj. śląskie) miana, co pośrednio wskazuje na intensywność przebytej inwazji. W innych krajach europejskich, wyniki zbliżone do wyników własnych, stwierdzono w m.in. w Belgii (70,2%) (Dorny i wsp., 2002) i Czechach (61,3%) (Svobodova i wsp., 1998). Niższą seroprewalencję notowano

we Włoszech (40,7–50,4%) (Macrí i wsp., 1992; D'amore, 1997; Papini i wsp. 2006) i na Węgrzech (47,6%) (Hornok i wsp.,). Seroprewalencja *T. gondii* wśród kotów w Hiszpanii wynosiła od 32,3% do 63,4% (Gauss i wsp., 2003; Miró i wsp., 2004).

Pomimo tego, że koty uważane są za pierwotne źródło *T. gondii* w środowisku, w dostępnej literaturze niewiele jest doniesień opisujących detekcje oocyst *T. gondii* w kale kotów, w warunkach naturalnych. Stąd, w następnym etapie pracy, badano próbki kału kotów z woj. śląskiego na obecność *T. gondii* przy pomocy badania mikroskopowego oraz technik PCR (nested i Real time). W badaniu mikroskopowym wynik dodatni stwierdzono jedynie dla 2 próbek (4,9%) kału, w których obserwowano struktury przypominające pod względem morfometrycznym oocysty *T. gondii*. Wynik badania mikroskopowego jednej z tych próbek został potwierdzony w Real Time PCR. Uzyskane wyniki badań koproskopowych wydają się potwierdzać wyniki innych autorów, którzy obecność oocyst *T. gondii* stwierdzali jedynie dla kilku procent badanych próbek kału lub uzyskiwali wyniki negatywne (Nabi i wsp., 2018; Schares i wsp., 2008). Uzyskane wyniki badań własnych wydają się również potwierdzać tezę o niewielkiej możliwości wykrycia oocyst podczas jednokrotnego badania próbek kału danej populacji kotów. Jednocześnie jednak, stwierdzony wysoki odsetek wyników seropozytywnych, może sugerować znaczne zanieczyszczenie środowiska pasożytami *T. gondii* i związane z tym ryzyko kontaminacji gleby, wody lub warzyw i owoców (Lass i wsp., 2009; Lass i wsp., 2012; Simon i wsp., 2017). O zanieczyszczeniu środowiska oocystami, mogą pośrednio świadczyć na tych terenach wysokie odsetki wyników seropozytywnych wśród zwierząt gospodarskich, m.in. kóz, świń i bydła (publikacje: H-2, H-5, H-7).

- b) Świnie i bydło.** Z epidemiologicznego punktu widzenia, przy ocenie rezerwuaru zwierzęcego *T. gondii*, najbardziej istotne znaczenie ma występowanie tego pasożyta u zwierząt rzeźnych, w szczególności u świń. Wieprzowina zawierająca cysty tkankowe pasożyta uważana jest za główne źródło inwazji *T. gondii* u ludzi w Europie i USA (van der Giessen i wsp., 2007; Kijlstra i wsp., 2009; Limon i wsp., 2017). Wykazano doświadczalnie istotną korelację między seropozytywnością u świń i obecnością w ich tkankach żywych pasożytów (Dubey i wsp., 1986; Dubey i wsp. 1995), stąd wyniki badań serologicznych świń mogą mieć bezpośrednie

zastosowanie dla oceny ryzyka. Najwyższe odsetki wyników seropozytywnych stwierdza się wśród świń starszych, hodowanych w gospodarstwach tradycyjnych, z wolnym wybiegiem, w których koty mają swobodny dostęp do pomieszczeń dla zwierząt i gdzie nie są zachowane prawidłowe warunki zoohigieniczne (Tenter i wsp., 2000; Robert-Gangneux i Darde, 2012). Innym gatunkiem zwierząt gospodarskich mogącym stanowić ważne źródło zarażenia *T. gondii* jest bydło, wśród którego stwierdza się dużą rozpiętość wyników seropozytywnych, m.in. 76,3% w Serbii (Klun i wsp., 2006), 45,6% w Szwajcarii (Tenter i wsp., 2000), 26% w Brazylii (Ogawa i wsp., 2005) i 7,3% w Hiszpanii (Panadero i wsp., 2010), co świadczy o częstym kontakcie tego gatunku zwierząt z pasożytem. Jednocześnie jednak, w warunkach naturalnych u bydła nie obserwuje się objawów klinicznych toksoplazmozy. Ponadto wykazano dość szybką utratę żywotności pasożyta obecnego w tkankach bydła, po jego doświadczalnym zarażeniu pasożytem. Trudność sprawia także interpretacja wyników badań serologicznych bydła. Uważa się, że brak jest jednoznacznej zależności między obecnością i poziomem swoistych przeciwciał a obecnością żywego pasożyta w tkankach bydła. Potwierdzają to badania z ostatnich lat, gdzie DNA lub żywego pasożyta izolowano także od bydła seronegatywnego (Opsteegh i wsp., 2011). W przeprowadzonej w ostatnich latach w Holandii ilościowej analizie ryzyka mikrobiologicznego (QMRA), surową wołowinę zidentyfikowano jako potencjalnie najważniejsze źródło inwazji dla człowieka w tym kraju (Opsteegh i wsp., 2011b).

Ocena stopnia zarażenia zwierząt rzeźnych, których mięso stanowi główne źródło pasożyta dla człowieka, prowadzona jest na całym świecie. Kierunek tych badań jest też zgodny z dyrektywą Unii Europejskiej (2003/99/WE z dnia 17 listopada 2003 r.) oraz z zaleceniami takich organizacji jak FAO, WHO i EFSA (FAO/WHO, 2014; EFSA, 2018). Dotychczasowe badania nad występowaniem *T. gondii* u świń i bydła w Polsce często miały charakter lokalny, dotyczyły ograniczonej liczby zwierząt lub były prowadzone wiele lat temu.

Stąd też w celu oceny rezerwuaru zwierzęcego *T. gondii* w kontekście ochrony zdrowia ludzi, przeprowadzono badania wybranych populacji świń i bydła z różnych rejonów Polski. Badania surowic przeprowadzono przy użyciu testu kompetycyjnego ELISA (cELISA) i odczynu aglutynacji bezpośredniej (DAT) (Toxo-Screen DA, bioMérieux) (publikacja **H-1 [Sroka i wsp. Preliminary assessment of the usefulness of cELISA test for screening of pig and cattle**

populations for the presence of antibodies against *Toxoplasma gondii*. Ann Agric Environ Med. 2011, 18, 335-339]). Badano łącznie 861 surowic od świń (rasy wpb i pbz, w wieku do 1 roku) pochodzących z terenu 8 województw oraz 865 surowic bydła (rasy ncb, w wieku do 18 lat) z terenu 11 województw. Wśród badanych świń najwyższe odsetki wyników dodatnich w DAT oraz cELISA stwierdzono w woj. lubuskim (odpowiednio 19,5% i 26,8%), kujawsko-pomorskim (21,2% i 21,2%), mazowieckim (19,4% i 20,6%) oraz dolnośląskim (18,7% i 20,0%). Najniższą seroprevalencję stwierdzono wśród świń z woj. wielkopolskiego (1,0% i 2%) oraz woj. opolskiego (7,2% i 7,2%). Wśród badanego bydła najwyższy odsetek wyników dodatnich w DAT i cELISA stwierdzono u zwierząt pochodzących z woj. lubelskiego (25,0% i 26,3%), świętokrzyskiego (20,0% i 22,5%) oraz kujawsko-pomorskiego (12,8% i 17,9%). Niższe odsetki wyników dodatnich stwierdzono u bydła z woj. pomorskiego (11,0% i 16,4%), podkarpackiego (14,5% i 12,9%) i mazowieckiego (12,7% i 12,7%), a najniższe z woj. wielkopolskiego (5,1% i 5,1%) i dolnośląskiego (8,0% i 4,0%). Większe różnice w odsetkach wyników dodatnich uzyskanych w DAT i cELISA stwierdzono u bydła z woj. podlaskiego (5,8% i 11,6%), kujawsko-pomorskiego (12,8% i 17,9%), pomorskiego (11,0% i 16,4%) i dolnośląskiego (8,0% i 4,0%). Stwierdzono również występowanie istotnie wyższych odsetków wyników dodatnich wśród zwierząt pochodzących z drobnych gospodarstw w porównaniu do zwierząt z dużych ferm (bydło - 23,8% / 10,8%; świnie – 17,6% / 2,2%) ($p < 0,001$).

Populacje świń i bydła z terenu woj. lubelskiego badano również serologicznie w ramach wcześniejszych badań dotyczących oceny źródeł zarażenia *T. gondii* na terenie wybranych gospodarstw wiejskich. (publikacja **H-5 [Sroka i wsp. Occurrence of *Toxoplasma gondii* infection in people and animals from rural environment of Lublin region – estimate of potential role of water as a source of infection. Ann Agric Environ Med. 2010, 17, 125-132]**). Próbkę surowicy badano na obecność p-ciał anty *T. gondii* klasy IgG przy użyciu DAT. Wśród badanych 67 świń i 74 szt. bydła wyniki seropozytywne stwierdzono u 17,9% świń i 33,8% bydła. Wśród wyników dodatnich stwierdzonych u bydła, najwyższy odsetek stanowiły wyniki o niskich mianach (32-64) – 88%, podczas gdy u świń przeważały (łącznie 75%) wyniki o mianach średnich (180-540) i wysokich (>1620).

Kozy. Jak wynika z literatury, zarażenie *T. gondii* często występuje u owiec i kóz (Dubey i Beattie, 1988; Masala i wsp. 2007; Mancianti i wsp. 2013). Pasożyta izolowano z mleka koziego naturalnie i eksperymentalnie zarażonych zwierząt co świadczy o potencjalnym zagrożeniu dla zdrowia ludzi (Mancianti i wsp. 2013; Dubey i wsp. 2014). Stąd celem moich kolejnych badań była ocena seroprewalencji w kierunku *T. gondii* wybranej populacji kóz. Wyniki badań przedstawiono w publikacji **H-7 [Sroka i wsp. Seroprevalence of Toxoplasma gondii infection in goats from the south-west region of Poland and the detection of T. gondii DNA in goat milk. Folia Parasitol. 64: 023 (2017)]**. W ramach badań przeprowadzono badanie surowic 73 kóz (samiec) pochodzących z 36 gospodarstw zlokalizowanych na terenie woj. śląskiego, przy użyciu DAT (Toxo-Screen DA, bioMérieux). W DAT dodatnie wyniki stwierdzono u 70% z 73 badanych kóz. Uzyskany odsetek wyników seropozytywnych u kóz jest zbliżony do seroprewalencji stwierdzanej u tego gatunku zwierząt w Polsce przez innych autorów (30–100%) (Michalski i Platt-Samoraj, 2004; Czopowicz i wsp. 2011). Wysokie odsetki wyników dodatnich u kóz stwierdzano także m.in. w Serbii (73,3%) i Rumunii (52,8%) (Iovu i wsp., 2012; Djokic i wsp., 2014). Stwierdzona w badaniach własnych wysoka seroprewalencja *T. gondii* u badanych kóz (70%) na terenie woj. śląskiego koresponduje z wynikami kotów z tego rejonu (publikacja H-4), u których stwierdzono zbliżony odsetek wyników seropozytywnych, co może potwierdzać tezę o znacznym zanieczyszczeniu środowiska oocystami.

Ad. III Ocena zanieczyszczenia *T. gondii* wybranych produktów pochodzenia zwierzęcego wraz charakterystyką molekularną pasożyta

- a) Produkty mięsne.** Kolejnym etapem moich badań nad rezerwuarem zwierzęcym i potencjalnymi źródłami zarażenia dla ludzi w Polsce, była próba detekcji pasożyta i jego charakterystyka molekularna, w surowych produktach mięsnych - wędlinach i mięsie mielonym, dostępnych w sprzedaży w Polsce (publikacja **H-6 [Sroka i wsp. Detection and molecular characteristics of Toxoplasma gondii DNA in retail raw meat products in Poland. Foodborne Pathog Dis. 2019, 16, 3, 195-204]**). Badania prowadzono w ramach realizacji projektu „Ochrona zdrowia zwierząt i zdrowia publicznego” (2014-2018) przez PIWet-PIB w Puławach. Próbkki wędlin i mięsa pozyskiwano w zakładach mięsnych oraz sklepach firmowych zakładów mięsnych,

zlokalizowanych w 13 województwach. Łącznie pozyskano i przebadano 3223 próbki surowych wędlin (wędzonek, kielbas, szynek) oraz surowego mięsa mielonego. Po wytrawieniu próbek pepsyną, z uzyskanego po odwirowaniu osadu, ekstrahowano DNA, które następnie badano przy pomocy PCR (odmiany: nested i Real time). W celu określenia typu klonalnego pasożyta przeprowadzano badanie RFLP PCR oraz dla części próbek, badanie PCR z użyciem dodatkowych 10 markerów genetycznych. Produkty amplifikacji poddawano sekwencjonowaniu, a uzyskane wyniki porównywano z sekwencjami referencyjnymi *T. gondii* w bazie BLAST. Wśród badanych ogółem 3223 próbek wędlin i mięsa, wyniki dodatnie w PCR stwierdzono dla 175 (5,4%) próbek, w tym 48 próbek wędzonek (27,4% ogółu próbek pozytywnych), 79 próbek kielbas (45,1%), 14 próbek szynek (8,0%) oraz 34 próbek mięsa mielonego (19,4%). Najwyższy odsetek dodatnich wyników uzyskano dla próbek pochodzących z woj. podkarpackiego (17,9%), małopolskiego (12,6%) i lubelskiego (10,8%) ($p < 0,001$). Natomiast odsetki wyników dodatnich dla próbek pochodzących z innych regionów Polska były znacząco niższe (0,3-6,6%) ($p < 0,001$). Odsetki wyników dodatnich w PCR dla poszczególnych rodzajów produktów mięsnych (wędzonek, kielbas, szynek, mięsa mielonego) wyniosły od 4,5% do 5,8%, a różnice między nimi nie były istotne statystycznie ($p > 0,05$). Najwyższą częstość występowania DNA pasożyta stwierdzono w produktach mięsnych pochodzących z Polski południowo-wschodniej – woj. małopolskiego i woj. podkarpackiego. Są to rejony z licznymi, małymi gospodarstwami, w których zwierzęta hodowane są w sposób tradycyjny, przez co mogą mieć częsty kontakt z potencjalnymi źródłami zarażenia.

Analiza sekwencji z wykorzystaniem dodatkowych markerów w PCR, wykazała istotnie częstsze występowanie typu III (49%) oraz w mniejszym stopniu typu II (17,3%) i typu I (10,2%). W przypadku 23,5% próbek, stwierdzono kombinację typów I/II lub II/III lub I/III. Jak wynika z literatury, dotychczas w Europie najczęściej identyfikowany był typ II *T. gondii* (Richomme i wsp., 2009; Aubert i wsp., 2010). Dotychczas brak było podobnej analizy izolatów *T. gondii* z terenu Polski. Uzyskane w badaniach własnych wyniki, w których wykazano znaczny udział typu III *T. gondii* wśród izolatów *T. gondii*, mogą być zgodne z wynikami Zia-Ali i wsp. (2007), którzy badali mięso kurczaków i owiec w Iranie, a także Lehmann i in. (2003), badających mięso świń w USA. Również w badaniach Vergara i in. (2018) oprócz typu I (3,9%) i typu II (5,8%), identyfikowano również

typ III u świń (3,9%). Dotychczas brak jest wystarczającej wiedzy nt. wpływu procesów technologicznych stosowanych przy produkcji wędlin (związanych m.in. z dodawaniem soli, azotynów i azotanów, koncentracją kwasów organicznych, czasem i temperaturą) na inaktywację cyst *T. gondii*. Specyfika produkcji różni się w zależności od gatunku wędliny. Dane z literatury wskazują na możliwość występowania pasożytów w stanie żywym w surowych wędlinach pomimo stosowania fizycznych i chemicznych zabiegów w procesie technologicznym (Warnekulasuriya i wsp., 1998; Herrero i wsp., 2017).

- b) Mleko kóz.** W ramach badań nad występowaniem *T. gondii* w produktach pochodzenia zwierzęcego dokonano oceny występowania pasożyta w surowym mleku kóz (publikacja **H-7 [Sroka i wsp. *Seroprevalence of Toxoplasma gondii* infection in goats from the south-west region of Poland and the detection of *T. gondii* DNA in goat milk. *Folia Parasitol.* 64: 023 (2017)]**). Próbkę mleka zostały pobrane od 60 kóz z woj. śląskiego i badane na obecność DNA *T. gondii* przy pomocy nested PCR i Real time PCR. W celu określenia typu klonalnego izolowanego pasożyta, wykonano dodatkowe badania z użyciem 6 markerów (multilocus PCR). Wśród badanych 60 próbek mleka, DNA *T. gondii* stwierdzono w 65% próbek w Real time PCR i w 43% próbek w nested PCR. Należy podkreślić, że 11 próbek mleka pozytywnych w PCR zostało pobrane od seronegatywnych samic. Amplifikacja z użyciem dodatkowych markerów (SAG1, 3'SAG2, 5'SAG2, SAG3, BTUB i GRA6) dla wybranych próbek dodatnich w nested PCR, była możliwa w różnym zakresie w odniesieniu do poszczególnych markerów. Dwie próbki były pozytywne odpowiednio: w czterech i trzech markerach, kolejne cztery próbki amplifikowano dla 2 markerów. W przypadku pozostałych 17 próbek, produkt amplifikacji otrzymano z użyciem jednego markera, a analiza sekwencyjna wykazała, że 14 z tych próbek stanowiło typ klonalny III. Dla części próbek stwierdzono także możliwą kombinację alleli różnych typów klonalnych. Brak amplifikacji z użyciem wszystkich markerów może wynikać m.in. z małej ilości izolowanego DNA z próbek mleka, która może być niewystarczająca zwłaszcza w przypadku amplifikacji fragmentów genów mających niewielką liczbę powtórzeń w genomie.

Wg literatury w Europie dominującym typem klonalnym *T. gondii* stwierdzanym u zwierząt jest typ II. We Francji typ II stwierdzono w ponad 90% przypadków toksoplazmozy wrodzonej u ludzi oraz w znacznej liczbie izolatów pochodzących

od zwierząt (Ajzenberg i wsp. 2002, Dardé 2008). Jednak badania przeprowadzone w Portugalii, Hiszpanii, Słowacji i Szwajcarii wskazują, że typ III (lub typ I) może być częstszy niż dotychczas sądzono (Fuentes i wsp. 2001; de Sousa i wsp., 2006; Turčeková i in. 2013; Turčeková i wsp. 2014; Berger-Schoch i wsp., 2011).

Stwierdzona w badaniach własnych znaczna częstość występowania DNA *T. gondii* w próbkach mleka kóz (65%), wskazuje na potencjalne ryzyko związane z konsumpcją, zarówno surowego mleka koziego jak i jego surowych produktów (np. sera lub serwatki). Wg dostępnej wiedzy, są to pierwsze w Polsce badania, które dotyczą charakterystyki molekularnej DNA *T. gondii* izolowanego z mleka koziego.

Ad. IV Występowanie *T. gondii* w wybranych elementach środowiska

- a) Badania kleszczy.** Brak jest pełnej wiedzy nt. źródeł i wektorów *T. gondii* w środowisku. Stwierdzana znaczna seroprevalencja *T. gondii* wśród wielu gatunków zwierząt wolnożyjących (do 40%), w tym u roślinożernych ssaków, dzikich gryzoni i ptaków, u których możliwość nabycia inwazji poprzez oocysty wydalone przez kota wydaje się mniej prawdopodobna niż u zwierząt gospodarskich, może wskazywać na istnienie innych, alternatywnych drogi transmisji pierwotniaka. Jednym z potencjalnych wektorów zarażenia *T. gondii* mogłyby być krwio pijne stawonogi, a w szczególności kleszcze. Badania eksperymentalne Deryło i wsp. (1978) wykazały możliwość transmisji *T. gondii* przez nimfy kleszczy *Ixodes ricinus*. We wstępnych badaniach prowadzonych na terenie Lubelszczyzny, wykazano po raz pierwszy w literaturze, obecność DNA *T. gondii* w kleszczach *Ixodes ricinus* (Sroka i wsp., 2003b). W ramach kontynuacji tego kierunku badań, oceniano występowanie *T. gondii* u kleszczy *I. ricinus* zebranych w północno-zachodniej Polsce w aspekcie ich potencjalnej roli jako wektora pasożyta. Wyniki badań przedstawiono w publikacji **H-8 [Sroka i wsp. Preliminary study on the occurrence of *Toxoplasma gondii* in *Ixodes ricinus* ticks from north-western Poland with the use of PCR. Ann Agric Environ Med. 2008, 15, 333-338]**. Ogółem, wśród 257 kleszczy badanych przy użyciu PCR, wyniki dodatnie stwierdzono u 12,7% z nich. Najwyższy odsetek występowania *T. gondii* stwierdzono u samic (27.9%), niższy u samców (12,3%) i najniższy u nimf (4.4%). Częstość występowania *T. gondii* u samic była istotnie statystycznie wyższa w

porównaniu do samców i nimf ($p < 0,01$). Analiza RFLP PCR amplifikatów genu B1 z kleszczy wykazała przynależność większości z nich do typu I (78,8%) oraz w niewielkim zakresie do typu II/III (6,1%), 15,1% izolatów określono jako atypowe. W kolejnym etapie tych badań, w tkankach myszy inokulowanych homogenatem z kleszczy wykazano obecność DNA *T. gondii*, jednak próby izolacji żywego pasożyta zakończyły się niepowodzeniem. W następnych badaniach prowadzonych na terenie Lubelszczyzny (2011-2012) wśród badanych 664 kleszczy *Dermacentor reticulatus* uzyskano niższy niż u kleszczy *Ixodes ricinus* z rejonu północno-zachodniego, odsetek wyników dodatnich - 3,2%. Jednak odsetek wyników dodatnich wśród kleszczy zebranych w rejonie Sobiboru był znacznie wyższy niż z pozostałych rejonów woj. lubelskiego i wynosił w zależności od postaci kleszczy, od 12% do 26% (średnio: 17%). Wyniki badań przedstawiono w publikacji **H-9 [Wójcik-Fatla i wsp. *Toxoplasma gondii* (Nicolle et Manceaux, 1908) detected in *Dermacentor reticulatus* (Fabricius) (Ixodidae). *Folia Parasitol* 2015, 62:055 (Open access)]**. Należy nadmienić, że w rejonie Sobiboru notowano uprzednio wysokie odsetki wyników seropozytywnych w kierunku *T. gondii* zarówno wśród ludzi jaki i wśród zwierząt (Sroka, 2001). Analiza RFLP dla próbek dodatnich w PCR dla genu B1 oraz z użyciem dodatkowych markerów genetycznych (GRA6, 3'SAG2, 5'SAG2, SAG3 i SAG1) wykazała, przynależność wszystkich izolatów DNA *T. gondii* do typu klonalnego I, jednak ze względu na brak amplifikacji z użyciem wszystkich markerów dla niektórych próbek, wyniki analizy należy uznać jako wstępne. Potwierdzeniem wyników badań własnych jest wykazanie w ostatnich latach również przez innych autorów wysokiego odsetka wyników dodatnich (64,9%) na obecność DNA *T. gondii* w kleszczach *Ixodes ricinus* zebranych na terenie Śląska (Asman i wsp., 2015) oraz niższego odsetka (4,5%) w kleszczach zebranych na terenie Słowińskiego Parku Narodowego (północna Polska) (Asman i wsp., 2017). Z kolei, niedawne badania doświadczalne Zhou i wsp. (2016) potwierdziły możliwość utrzymywania się *T. gondii* w stanie żywym w kleszczach *H. longicornis*, bytujących w Azji. Powyższe dane mogą skłaniać do rewizji dotychczasowych poglądów dotyczących dróg transmisji tego pasożyta zwłaszcza w środowisku sylwatyicznym oraz do kontynuacji badań w tym zakresie.

- b) Badania wody.** Woda konsumpcyjna oraz woda rekreacyjna (jeziora, stawy, rzeki) mogą stanowić istotne źródła zarażenia pasożytniczymi pierwotniakami dla ludzi i

zwierząt. Na świecie opisano przypadki wodnopochoďnych ognisk zachorowań ludzi na toksoplazmozę (Benenson i wsp. 1982; Bahia-Oliveira i wsp., 2003; Bobić i wsp. 2007). W Polsce niewiele wiadomo na temat skali zanieczyszczenia wody pitnej formami dyspersyjnymi tych pasożytów. Rozprzestrzenianiu zanieczyszczenia środowiska oocystami, sprzyja oddziaływanie sił natury w postaci wiatru i opadów, co z kolei może prowadzić do zanieczyszczenia wód powierzchniowych i podziemnych. W Polsce wschodniej, nadal powszechnie wykorzystywane są płytkie studnie przydomowe, do których łatwo mogą przenikać zanieczyszczenia chemiczne i biologiczne z najbliższego otoczenia. Studnie przydomowe nie są objęte stałym monitoringiem stosowanym dla systemów wodociągowych, które jednak również nie są objęte badaniami na obecność patogennych pierwotniaków. Woda studzienna nie jest uzdatniana ani filtrowana, stąd obecność w wodzie form inwazyjnych pasożyta (oocyst) może stanowić poważne ryzyko dla zdrowia mieszkańców gospodarstw wiejskich oraz hodowanych w nich zwierząt. Stąd celem moich kolejnych badań była ocena częstości występowania *T. gondii* w wodzie pitnej w gospodarstwach rolnych z terenu Lubelszczyzny w aspekcie potencjalnego zagrożenia zdrowia mieszkańców wsi. Wyniki tych badań przedstawiono w publikacji H-5 [Sroka i wsp. ***Occurrence of Toxoplasma gondii infection in people and animals from rural environment of Lublin region – estimate of potential role of water as a source of infection. Ann Agric Environ Med. 2010, 17, 125-132***]. Badania dotyczące ludzi, zwierząt oraz wody prowadzono na terenie 164 gospodarstw, położonych w 35 miejscowościach, w 12 powiatach województwa lubelskiego. Badano łącznie 182 próbki wody pitnej, w tym: 121 próbek pochodzących z płytkich studni zlokalizowanych na terenie gospodarstw, 33 próbki z głębszych studni wierconych oraz 28 próbek wody wodociągowej. Badano również próbki wody z 19 jezior Pojezierza Łęczyńsko-Włodawskiego. Obecność oocyst *T. gondii* stwierdzono w badaniu mikroskopowym w 12,6% próbek wody, natomiast DNA *T. gondii* stwierdzono metodą PCR w 22,5% próbek. Wśród badanych 19 próbek wody pobranych z kąpielisk na jeziorach, zarówno w badaniu mikroskopowym jak i PCR stwierdzono 2 wyniki dodatnie (10,5%). Próba biologiczna na myszach potwierdziła obecność żywych pasożytów *T. gondii* dla 9 z 14 próbek dodatnich w PCR (64,3%). Badanie RFLP-PCR w oparciu o gen B1 wykazało, że większość izolowanych szczepów *T. gondii* (78,0%) należało do typu I, natomiast 7,3% i 14,7% izolatów należało

odpowiednio: do typu II/III oraz było atypowe. W przeciwieństwie do wyników wcześniejszych badań własnych na terenie Lubelszczyzny (Sroka i wsp, 2006), gdzie stwierdzono istotną korelację między piciem surowej wody przez mieszkańców gospodarstw (zwłaszcza o złym stanie higienicznym) a występowaniem u nich wyników seropozytywnych w kierunku *T. gondii* ($p < 0,05$), w obecnych badaniach takiej istotnej korelacji nie stwierdzono, co pośrednio może świadczyć o wykorzystywaniu przez mieszkańców większości badanych gospodarstw również innych źródeł wody do konsumpcji niż przydomowe studnie. Jednocześnie jednak, stwierdzenie obecności *T. gondii* w wodzie wykorzystywanej do spożycia na terenie badanych gospodarstw, stanowi dowód na istnienie realnego ryzyka zarówno dla ludzi jak i zwierząt. Dlatego wydaje się konieczne wdrożenie odpowiednich działań profilaktycznych.

Osiągnięcia:

- Opracowanie nowego testu cELISA, jak również porównanie skuteczności i optymalizacja istniejących już metod do detekcji przeciwciał anty *T. gondii* oraz oocyst pasożyta, pozwala na wdrożenie skuteczniejszych metod do diagnostyki toksoplazmozy, wykorzystywanych zarówno w działalności naukowej jak i usługowej.
- Potwierdzono znaczną ekstensywność inwazji *T. gondii* u gatunków zwierząt (koty, świnie, bydło i kozy) uznawanych za ważne rezerwuary tego pasożyta w Polsce, co wskazuje na potencjalne zagrożenie dla zdrowia ludzi i konieczność wdrażania działań profilaktycznych.
- Po raz pierwszy na skalę krajową, przeprowadzono badania surowych produktów mięsnych dostępnych w handlu, wykazując dość znaczny stopień ich zanieczyszczenia pasożytem *T. gondii*. Dokonano również charakterystyki molekularnej izolowanego pasożyta wykazując znaczną częstość występowania typu III *T. gondii*, unikalnego w Europie.
- Wykazano znaczną częstość występowania DNA *T. gondii* w próbkach mleka kóz (65%), co wskazuje na potencjalne ryzyko związane z konsumpcją surowego mleka koziego oraz surowych produktów z tego mleka. Wg dostępnej wiedzy, są to pierwsze w Polsce badania, w których dokonano charakterystyki molekularnej DNA *T. gondii* izolowanego z mleka koziego.
- Wykazanie obecności DNA *T. gondii* w kleszczach bytujących w warunkach naturalnych, może skłaniać do rewizji dotychczasowych poglądów dotyczących dróg transmisji pasożyta *T. gondii*, szczególnie w środowisku sylwatyicznym,

jednak w celu potwierdzenia roli kleszczy w epidemiologii toksoplazmozy, wymagane są dalsze badania.

- Stwierdzenie obecności *T. gondii* w wodzie pitnej oraz rekreacyjnej wskazuje na realne zagrożenie zdrowia ludzi i zwierząt oraz skłania do wdrożenia odpowiednich działań profilaktycznych, zwłaszcza na terenach wiejskich.

Piśmiennictwo

1. Ajzenberg D, Banuls AL, Tibayrenc M, Darde ML. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *Int J Parasitol.* 2002, 32, 27–38.
2. Ajzenberg D. Type I strains in human toxoplasmosis: myth or reality? *Future Microbiology.* 2010, 5, 841–843.
3. Asman M., Solarz K., Cuber P., Gąsior T, Szilman P, Szilman E, Tondaś E, Matzullok A., Kusion N., Florek K. Detection of protozoans *Babesia microti* and *Toxoplasma gondii* and their co-existence in ticks (Acari: *Ixodida*) collected in Tarnogórski district (Upper Silesia, Poland). *Ann Agric Environ Med.* 2015, 22, 80–83.
4. Asman M., Nowak-Chmura M., Solarz K., Szilman E., Semla M, Zyśk B. *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia microti*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Toxoplasma gondii* in *Ixodes ricinus* (Acari, Ixodida) ticks collected from Slowinski National Park (Northern Poland). *J Vector Ecol.* 2017, 42, 200–202. doi: <https://doi.org/10.1111/jvec.12258>
5. Aubert D, Ajzenberg D, Richomme C, Gilot-Fromont E, Terrier ME, de Gevigney C, Game Y, Maillard D, Gibert P, Darde ML, Villena I. Molecular and biological characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in France. *Vet Parasitol.* 2010, 171, 346–349.
6. Bahia-Oliveira LMG, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CCF, Oréfice F, Addiss DG. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2003, 9, 55–62.
7. Barutzki D., Schaper R. Endoparasites in dogs and cats in Germany 1999–2002. *Parasitol Res.* 2003, 90 (Suppl. 3), 148–150.
8. Benenson MW, Takafuji ET, Lemon SM, Greenup RL, Sulzer AJ. Oocyst-transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water. *N Engl J Med.* 1982, 307, 666–669.
9. Berger-Schoch AE, Herrmann DC., Schares G, Müller N, Bernet D, Gottstein B, Frey CF. Prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* in feline faeces (oocysts) and meat from sheep, cattle and pigs in Switzerland. *Vet Parasitol.* 2011, 177, 290–297.
10. Bobic B, Nikolic A, Klun I, Vujanic M, Djurkovic-Djakovic O. Undercooked meat consumption remains the major risk factor for *Toxoplasma* infection in Serbia. *Parassitologia.* 2007, 49, 227–230.
11. Brandon-Mong G.J., Che Mat Seri N.A., Sharma R.S., Andiappan H., Tan T.C., Lim Y.A., Nissapatorn V.: Seroepidemiology of toxoplasmosis among people having close contact with animals. *Front Immunol.* 2015, 6, 143.
12. Chemoh W, Sawangjaroen N, Nissapatorn V, Sarmwittayawon N. Molecular investigation on the occurrence of *Toxoplasma gondii* oocysts in cat faeces using TOX-element and ITS-1 region targets. *Vet J.* 2016, 215, 118–122.
13. Czopowicz M, Kaba J, Szaluś-Jordanow O, Nowicki M, Witkowski L, Frymus T. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in goats in Poland. *Vet. Parasitol.* 2011, 178, 339–341.

14. D'amore E, Falcone E, Butani L, Tollis M. A serological survey of Feline immunodeficiency virus and *Toxoplasma gondii* in stray cats. *Vet Res Com.* 1997, 21, 355–359.
15. Dardé ML. *Toxoplasma gondii*, “new” genotypes and virulence. *Parasite.* 2008, 15, 366–371.
16. Dawson D. Foodborne protozoan parasites. *Int Food Microbiol.* 2005, 103, 207–227.
17. de Sousa S, Ajzenberg D, Canada N, Freire L, Da Costa JM, Dardé ML, Thulliez P, Dubey JP. Biologic and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs from Portugal. *Vet Parasitol.* 2006, 135, 133–136.
18. Deryło A, Toś-Luty S, Dutkiewicz J, Umiński J: Badania nad udziałem kleszczy *Ixodes ricinus* L. w biologii i przenoszeniu *Toxoplasma gondii*. *Wiad Parazytol.* 1978, 24, 585–598.
19. Dias RA, Navarro IT, Ruffolo BB, Bugni FM, Castro MV, Freire RL. *Toxoplasma gondii* in fresh pork sausage and seroprevalence in butchers from factories in Londrina, Paraná State, Brazil, *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2005, 47, 185–189.
20. Djokic V, Klun I, Musella V, Rinaldi L, Cringoli G, Sotiraki S, Djurkovic-Djakovic O. Spatial epidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in goats in Serbia. *Geospat. Hlth.* 2014, 8, 479–488.
21. Dorny P, Speybroeck N, Verstraete S, Baeke M, de Becker A, Berkvens D, Vercruysse J. Serological survey of *Toxoplasma gondii*, feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in urban stray cats in Belgium. *Vet Rec.* 2002; 151, 626–629.
22. Dubey JP. Direct development of enteroepithelial stages of *Toxoplasma* in the intestines of cats fed cysts. *Am J Vet Res.* 1979, 40, 1634–1637.
23. Dubey JP. A review of toxoplasmosis in cattle. *Vet Parasitol.* 1986, 22, 177–202.
24. Dubey JP, Murrell KD, Fayer R, Schad GA. Distribution of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in commercial cuts of pork. *J Am Vet Med Assoc.* 1986, 188, 1035–1037.
25. Dubey JP, Beattie CP. *Toxoplasmosis of Animals and Man.* Boca Raton, CRC Press Inc, 1988.
26. Dubey JP. Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T. gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. *Am J Vet Res.* 1988, 49, 910–913.
27. Dubey JP, Thulliez P, Weigel RM, Andrews CD, Lind P, Powell EC. Sensitivity and specificity of various serologic tests for detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sows. *Am J Vet Res.* 1995a, 56, 1030–1036.
28. Dubey J.P.: The history of *Toxoplasma gondii*-the first 100 years. *J Eukaryot Microbiol.* 2008, 55, 467–475.
29. Dubey JP. Toxoplasmosis in domestic cats and other felids. In: *Toxoplasmosis of Animals and Humans*, 2nd ed. CRC Press, Taylor & Francis Group; 2010. p. 95–118.
30. Dubey J.P., Verma S.K., Ferreira L.R., Oliveira S., Cassinelli A.B., Ying Y., Kwok O.Ch, Tuo W., Chiesa O.A., Jones I.L. Detection and survival of *Toxoplasma gondii* in milk and cheese from experimentally infected goats. *J Food Prot.* 2014, 77, 10, 1747–1753.
31. EFSA, 2007. European Food Safety Authority. (2007). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from EFSA on Surveillance and monitoring of *Toxoplasma* in humans, foods and animals. *The EFSA Journal*, 583, 1–64.
32. EFSA, 2018. EFSA Scientific Opinion on the public health risks associated with food-borne parasites. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) doi: 10.2903/j.efsa.2018.5495
33. FAO/WHO, 2014. „Multicriteria-Based Ranking for Risk Management of Food-Born Parasites”. Microbiological Risk Assessment Series (MRA) 23. FAO/WHO 2014.
34. Fuentes I, Rubio JM, Ramí rez C, Alvar J. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: Direct analysis from clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2001, 39, 1566–1570.
35. Gauss CB, Almería S, Ortuno A, Garcia F, Dubey JP. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic cats from Barcelona, Spain. *J Parasitol.* 2003, 89, 1067–1068.

36. Herrero L, Gracia MJ, Perez-Arquillue C, Lazaro R, Herrera A, Bayarri S. *Toxoplasma gondii* in raw and dry-cured ham: The influence of the curing proces. Food Microbiol. 2017, 65, 213– 220.
37. Holec-Gasior L., Stańczak J., Myjak P., Kur J. Occurrence of *Toxoplasma gondii* specific antibodies in group of forestry workers from pomorskie and warmińsko-mazurskie provinces. Wiad Parazytol. 2008, 54, 231-236.
38. Holec-Gasior L, Kur J. Epidemiological studies of toxoplasmosis among women from Przodkowo commune. Przegl Epidemiol. 2009, 63, 311-316.
39. Hornok S, Edelhofer R, Joachim A, Farkas R, Berta K, Répási A, Lakatos B. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infection of cats in Hungary. Acta Vet Hung. 2008, 56, 81–88.
40. Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: Correlation of parasite genotype with human disease. J Infect Dis. 1995, 172, 1561–1566.
41. Iovu A, Gyoerke A, Mircean V, Gavrea R, Cozma V. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dairy goats from Romania. Vet. Parasitol. 2012, 186, 470–474.
42. Jones JL, Dargelas V, Roberts J, Press C, Remington JS, Montoya JG: Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in the United States. Clinical Infectious Diseases. 2009, 49, 878-884.
43. Kijlstra A, Eissen OA, Cornelissen J, Munniksma K, Eijck I, Kortbeek T. *Toxoplasma gondii* infection in animal-friendly pig production systems. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004, 45, 165–169.
44. Kijlstra A, Meerburg BG, Bos AP. Food safety in free-range and organic livestock systems: Risk management and responsibility. J Food Prot. 2009, 12, 2448–2681.
45. Klun I, Djurkovic-Djakovic O, Katic-Radivojevic S, Nikolic A. Crosssectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia: seroprevalence and risk factors. Vet Parasitol. 2006, 135, 121–131.
46. Kocięcka W, Pietrzak H, Rehliś N, Mrozewicz B: Toksoplazmoza środowisk rodzinnych, II. Analiza kliniczna. Przegl Epid. 1998, 52, 3, 297-307.
47. Lass A, Pietkiewicz H, Modzelewska E, Dumètre A, Szostakowska B, Myjak P. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental soil samples using molecular methods. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009, 28, 599–605.
48. Lass A, Pietkiewicz H, Szostakowska B, Myjak P. The first detection of *Toxoplasma gondii* DNA in environmental fruits and vegetables samples. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012, 31, 1101–1108.
49. Lehmann T, Graham DH, Dahl E. Transmission dynamics of *Toxoplasma gondii* on a pig farm. Infect Gen Evol. 2003, 3, 135–141.
50. Lehmann T, Marcet PL, Graham DH, Dahl ER, Dubey JP. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. Proc Natl Acad Sci USA. 2006, 103, 11423–11428.
51. Limon G, Beauvais W, Dadios N, Villena I, Cockle C, Blaga R, Guitian J. Cross-sectional study of *Toxoplasma gondii* infection in pig farms in England. Foodborne Pathog Dis. 2017, 14, 269–281.
52. Macrí G, Masotti GF, Scholl F, Faini A, Villini E. Toxoplasmosi felina: sieropositività in un campione di gatti domestici e randagi. Atti Soc It Sc Vet. 1992, 46, 1413–1417.
53. Mancianti F., Nardoni S., D’Ascenzi C., Pedonese F., Mugnaini L., Franco F., Papini R.: Seroprevalence, detection of DNA in blood and milk, and genotyping of *Toxoplasma gondii* in a goat population in Italy. Biomed Res Int. 2013, 905326. Doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/905326>
54. Masala G, Porcu R, Daga C, Denti S, Canu G, Patta C, Tola S. 2007: Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR. J Vet Diagn Invest. 19, 96–98.
55. Michalski M, Platt-Samoraj A. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cats from Olsztyn city. Wiad Parazytol. 2004, 50, 303– 305.

56. Michalski M, Platt-Samoraj A. Extent of *Toxoplasma gondii* invasion in goat and sheep from the Olsztyn region. *Med Wet.* 2004, 60, 70–71.
57. Michalski M, Platt-Samoraj A, Mikulska-Skupień E. *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic cats in Olsztyn urban area, Poland. *Wiad Parazytol.* 2010, 56, 277–279.
58. Miró G, Montoya A, Jiménez S, Frisuelos C, Mateo M, Fuentes I. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* and intestinal parasites in stray, farm and household cats in Spain. *Vet Parasitol.* 2004, 126, 249–55.
59. Nabi H, Rashid MI, Islam S, Bajwa AA, Gul R, Shehzad W i in. Prevalence of *Toxoplasma gondii* oocysts through Copro-PCR in cats at Pet Center (UVAS), Lahore, Pakistan. *J PMA. J Pak Med Assoc.* 2018, 68, 115–118.
60. Nowakowska D, Stray-Pedersen B, Spiewak E, Sobala W, Małafiej E, Wilczyński J. Prevalence and estimated incidence of *Toxoplasma* infection among pregnant women in Poland: A decreasing trend in the younger population. *Clin Microbiol Infect.* 2006b, 12, 913–917.
61. Nowakowska D, Wujcicka W, Sobala W, Śpiewak E, Gaj Z, Wilczyński J. Age-associated prevalence of *Toxoplasma gondii* in 8281 pregnant women in Poland between 2004 and 2012. *Epidemiol Infect.* 2014, 142, 656–661.
62. Ogawa L, Freire RL, Vidotto O, Gondim LFP, Navarro IT: Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dairy cattle from the northern region of the Paraná State, Brazil. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2005, 57, 312–316.
63. Opsteegh M, Teunis P, Züchner L, Koets A, Langelaar M, van der Giessen J. Low predictive value of seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle for detection of parasite DNA. *Int J Parasitol.* 2011a, 41, 343–354. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.10.006.
64. Opsteegh M, Prickaerts S, Frankena K, Evers EG. A quantitative microbial risk assessment for meatborne *Toxoplasma gondii* infection in The Netherlands. *Int J Food Microbiol.* 2011b, 150, 103–14. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.022
65. Panadero R, Paineira A, López C, Vázquez L, Paz A, Díaz P, Dacal V, Cienfuegos S, Fernández G, Lago N, Díez-Baños P, Morrondo P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wild and domestic ruminants sharing pastures in Galicia (Northwest Spain). *Res Vet Sci* 2010;88:111–115.
66. Papini R, Sbrana C, Rosa B, Saturni AM, Sorrentino AM, Cerretani M, Guidi G. Serological survey of *Toxoplasma gondii* infections in stray cats from Italy. *Rev Med Vet.* 2006, 157, 193–196.
67. Paul M, Petersen E, Szczapa J. Prevalence of congenital *Toxoplasma gondii* infection among newborns from the Poznań region of Poland: validation of a new combined enzyme immunoassay for *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin A and immunoglobulin M antibodies. *J Clin Microbiol.* 2001, 39, 1912–1916.
68. Pena HFJ, Gennari SM, Dubey JP, Su C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int J Parasitol.* 2008, 38, 561–569.
69. Richomme C, Aubert D, Gilot-Fromont E, Ajzenberg D, Mercier A, Ducrot C, Ferte H, Delorme D, Villena I. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from wild boar (*Sus scrofa*) in France. *Vet Parasitol.* 2009, 164, 296–300.
70. Robert-Gangneux F, Darde ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev.* 2012, 25, 264–96.
71. Salant H, Spira D, Hamburger J. A comparative analysis of coprologic diagnostic methods for detection of *Toxoplasma gondii* in cats. *Am J Trop Med Hyg.* 2010, 82, 865–870.
72. Schares G, Vrhovec MG, Pantchev N, Herrmann DC, Conraths FJ. Occurrence of *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* oocysts in the faeces of cats from Germany and other European countries. *Vet Parasitol.* 2008, 152, 34–45.
73. Simon JA, Kurdzielewicz S, Jeannot E, Dupuis E, Marnef F, Aubert D et al. Spatial distribution of soil contaminated with *Toxoplasma gondii* oocysts in relation to the distribution and use of domestic cat defecation sites on dairy farms. *Int J Parasitol.* 2017, 47, 357–367.
74. Sroka J, Zwoliński J, Dutkiewicz J. The prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies among abattoir workers in Lublin. *Wiad Parazytol.* 2003a, 49, 47–55.

75. Sroka J, Chmielewska-Badora J, Dutkiewicz J: *Ixodes ricinus* as a potential vector of *T. gondii*. Ann Agric Environ Med. 2003b, 10, 121-123.
76. Sroka J, Szymańska J: Analysis of prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in selected rural households in the Lublin region. Bull Vet Inst Pulawy. 2012, 56, 529-534.
77. Sroka J, Wójcik-Fatla A, Dutkiewicz J: Occurrence of *Toxoplasma gondii* in the water from wells located on farms. Ann Agric Environ Med 2006, 13, 169-175.
78. Sroka J: Seroepidemiology of toxoplasmosis in the Lublin region. Ann Agric Environ Med. 2001, 8, 25-31.
79. Su C, Shwab EK, Zhou P, Zhu XQ, Dubey JP. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. Parasitology. 2010, 137, 1-11.
80. Svobodova V, Knotek Z, Svoboda M. Prevalence of IgG and IgM antibodies specific to *Toxoplasma gondii* in cats. Vet Parasitol. 1998, 80, 173-176.
81. Torgerson PR, Mastroiacovo P. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. Bull World Health Organ. 2013;91: 501-8. 10.2471/BLT.12.111732
82. Tenter AM, Heckeroth, AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol. 2000, 30, 1217-1258.
83. Turčėková L, Antolová D, Reiterová K, Spišák F. Occurrence and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in naturally infected pigs. Acta Parasitol. 2013, 58, 361-366.
84. Turčėková L, Hurníková Z, Spišák F, Miterpáková M, Chovancová M. *Toxoplasma gondii* in protected wildlife in the Tatra National Park (TANAP), Slovakia. Ann Agric Environ Med. 2014, 21, 235-238.
85. Uwatoko K, Sunairi M, Yamamoto A, Nakajima M, Yamaura K. Rapid and efficient method to eliminate substances inhibitory to the polymerase chain reaction from animal fecal samples. Vet Microbiol. 1996, 52, 73-79.
86. van der Giessen J, Fonville M, Bouwknegt M, Langelaar M, Vollema A. Seroprevalence of *Trichinella spiralis* and *Toxoplasma gondii* in pigs from different housing systems in The Netherlands. Vet Parasitol. 2007, 148, 371-374.
87. Vergara A, Marangi M, Caradonna T, Pennisi L, Paludi D, Papini R, Ianieri A, Giangaspero A, Normanno G. *Toxoplasma gondii* lineages circulating in slaughtered industrial pigs and potential risk for consumers. J Food Prot. 2018, 81, 1373-1378.
88. Villari S, Vesco G, Petersen E, Crispo A, Buffolano W. Risk factors for toxoplasmosis in pigs bred in Sicily, Southern Italy. Vet Parasitol. 2009, 161, 1-8.
89. Warnekulasuriya MR, Johnson JD, Holliman RE. Detection of *Toxoplasma gondii* in cured meats. Int J Food Microbiol. 1998, 45, 211-215.
90. Wąsiatycz G. Ekstensywność zarażenia kotów *Toxoplasma gondii* w Poznaniu i jego okolicy w aspekcie niebezpieczeństwa inwazji tego pierwotniaka dla człowieka. Wiad Parazytol. 1998, 44: 693-704.
91. WHO, 2015. WHO Estimates of the Global Burden of Foodborne Disease: Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group 2007-2015. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2015.
92. Zhou Y, Zhang H, Cao J, Gong H, Zhou J. Epidemiology of toxoplasmosis: role of the tick *Haemaphysalis longicornis*. Infectious Diseases of Poverty. 2016, 5, 14. doi: 10.1186/s40249-016-0106-0.
93. Zia-Ali N, Fazaeli A, Khoramizadeh M, Ajzenberg D, Darde M, Keshavarz-Valian H. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* strains from different hosts in Iran. Parasitol Res. 2007, 101, 111-115.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych)

Od początku swojej pracy zajmowałem się zagadnieniami związanymi z epidemiologią i diagnostyką zoonoz, ze szczególnym uwzględnieniem toksoplazmozy, kleszczowego zapalenia mózgu (TBE), boreliozy i jersiniozy. W ramach pracy byłem zaangażowany w działalność naukową, związaną z badaniami nad zagrożeniami zdrowotnymi ludności wiejskiej, chorobami odzwierzęcymi o charakterze zawodowym, w tym chorobami odkleszczowymi. W swojej pracy zapoznałem się z teorią i praktyką wykonywania szeregu testów serologicznych stosowanych w badaniach w kierunku toksoplazmozy, boreliozy, kleszczowego zapalenia mózgu, echinokokozy, chlamydiozy, echinokokozy i toksokarozy. W badaniach wykorzystywałem również metody izolacji na zwierzętach laboratoryjnych oraz metodę PCR. W ramach pracy w IMW, uczestniczyłem w realizacji 16 zadań i projektów badawczych, w tym w 5 projektach finansowanych przez MNiSW, w 2 z nich byłem kierownikiem projektu (6P05D06120 i N404 071 31/3214). Byłem również kierownikiem 8 tematów statutowych. Ich tematyka obejmowała m.in. zagadnienia toksoplazmozy, kryptosporidiozy, giardiozy, chorób odkleszczowych oraz metod diagnostycznych.

Od roku 2007 rozpocząłem pracę w Zakładzie Parazytologii i Chorób Inwazyjnych (ZP) Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach. Od początku swojej pracy w ZP biorę czynny udział w działalności naukowej. Zajmuję się tematyką badawczą w szczególności związaną z toksoplazmozą, jestem osobą odpowiedzialną za działalność Krajowego Laboratorium Referencyjnego ds. Toksoplazmozy, działającego w PIWet-PIB. W kręgu moich zainteresowań naukowych są również inwazje wywoływane przez inne pasożytnicze pierwotniaki, m.in. z rodzaju *Cryptosporidium*, *Giardia* i *Neospora*.

W ramach pracy w ZP uczestniczyłem w realizacji 27 zadań i projektów badawczych, w tym 4 projektów finansowanych przez MNiSW i NCN; w 1 z projektów finansowanych przez MNiSW byłem jego kierownikiem (N N308 577039). Uczestniczyłem także w realizacji 2 projektów finansowanych przez MRiRW, w których byłem kierownikiem tematów wchodzących w skład projektu (G/005 i P/013). Uczestniczyłem także w realizacji 13 tematów statutowych PIWet-PIB (w tym, w 5 - jako kierownik tematu). Ich tematyka obejmowała m.in. zagadnienia toksoplazmozy, echinokokozy, *Taenia solium*, *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, a także parazytologicznego badania osadów ściekowych.

Ponadto, uczestniczyłem w realizacji 8 zadań programu wieloletniego (w 3 jako kierownik zadania i w 2 jako osoba odpowiedzialna za realizację ze strony ZP), które obejmowały swoją tematyką m.in. rozprzestrzenienie pierwotniaków *Toxoplasma gondii* oraz *Cryptosporidium* i *Giardia* w populacji świń i bydła, występowanie *T. gondii* w produktach pochodzenia zwierzęcego, a także inwazję *Echinococcus* u lisów, psów i zwierząt rzeźnych.

Dokładne dane dotyczące w/w projektów badawczych przedstawiono w **załączniku nr 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego**. W załączniku tym zamieszczono także pełny spis moich osiągnięć w postaci szczegółowych wykazów: publikacji, działalności dydaktycznej, wykonanych recenzji, nagród, udziału w

konferencjach naukowych, członkostwa w organizacjach naukowych, staży naukowych, a także mojego udziału w działalności referencyjnej Zakładu Parazytologii i Chorób Inwazyjnych.

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

Badania nad występowaniem pierwotniaków *Cryptosporidium* spp. i *Giardia duodenalis* u zwierząt i w środowisku

Zarażenia wywołane pasożytniczymi pierwotniakami *Cryptosporidium* spp. i *Giardia duodenalis* stanowią stały problem zdrowotny u ludzi i zwierząt na całym świecie. Pasożyty te mogą powodować poważne zagrożenie zdrowia zwłaszcza dla osób z obniżoną odpornością, powodując m.in. zaburzenia gastryczne, w tym uporczywą biegunkę, czego konsekwencją jest szybkie odwodnienie organizmu. Tematyka dotycząca kryptosporidiozy i giardiozy jest jednym z głównych kierunków moich badań od kilku lat. W ZP prowadzona jest diagnostyka usługowa dot. badania próbek wody, kału i ścieków w kierunku w/w pasożytów. Jedną z wdrożonych do działalności usługowo-badawczej procedur (ZP/PB-49) jest procedura akredytowaną w Polskim Centrum Akredytacji (PCA).

W ramach mojej działalności naukowej uczestniczyłem w badaniach oceniających ekstensywność inwazji *Giardia duodenalis* w populacji wolno żyjących zwierząt z terenu Pojezierza Łęczyńsko-Włodawskiego. W ramach pracy, badano próbki kału zebrane z 32 różnych miejsc tego rejonu, pochodzące od ogółem 162 zwierząt. Próbkę kału badano na obecność pasożytów *Giardia* przy użyciu testu fluorescencji bezpośredniej (DFA) i PCR (fragment genu β -giardin). W DFA obecność cyst *G. duodenalis* stwierdzono w 12 (7%) próbkach kału, w tym: u 4 dzików (15%), 4 lisów (19%), dwóch saren (4%) i dwóch wilków (29%). W PCR stwierdzono 34 (21%) próbki dodatnie, w tym u 11 dzików (41%), 5 jeleni (18%), 11 saren (23%), 4 łosi (17%), 2 wilków (29%) i jednego borsuka. Analiza sekwencyjna wykazała obecność genotypu zoonotycznego "B" *Giardia* u dzików, jeleni i saren, natomiast w próbkach wilków zidentyfikowano genotyp "D". Genotyp B *Giardia* został po raz pierwszy wykazany u dzików i jeleni.

W kolejnych badaniach badano próbki kału pobrane od 297 zwierząt gospodarskich, z 18 gospodarstw z terenu Pojezierza Łęczyńsko-Włodawskiego. Badano próbki kału od 86 szt. bydła, 84 świń, 81 owiec, 10 koni i 36 psów na obecność *Giardia duodenalis* przy użyciu DFA i PCR. Ogółem, w DFA cysty *Giardia* wykryto w 22,2% próbek kału, w tym: u 29,8% badanych świń, 21,0% owiec, 18,6% bydła, 10% koni i 19,4% psów. W PCR (fragment genu β -giardin) wyniki dodatnie stwierdzono w 13,1% próbek, w tym: u 28,1% owiec, 11,6% bydła, 10% koni, 9,5% świń i 5,6% psów. Analiza sekwencyjna wykazała obecność genotypu A (8 próbek), B (1 próbka) i E (18 próbek).

Ze względu na to, w badaniach zwierząt, genotypy zoonotyczne *Giardia* (A i/lub B) stwierdzono zarówno u niektórych gatunków zwierząt wolno żyjących jak i gospodarskich z terenu Pojezierza Łęczyńsko-Włodawskiego, gatunki te można uznać za potencjalne źródło zarażenia *Giardia* dla ludzi na tym terenie.

Innym kierunkiem badań była ocena potencjalnego wpływu bobrów na zanieczyszczenie *Giardia duodenalis* i *Cryptosporidium* spp. wód z jezior, w aspekcie zagrożenia zdrowia ludzi. W ramach badań pobrano 79 próbek wody z otoczenia żeremii bobrów, w 14 lokalizacjach położonych na Pojezierzu Mazurskim. Próbki wody pobierano w sezonach wiosennych i jesiennych, w różnych odległościach od żeremii bobrów (0-2, 10, 30 i 50 m). Próbki badano na obecność (oo)cyst *Giardia duodenalis* i *Cryptosporidium* spp. przy użyciu DFA i PCR. W DFA obecność cyst *Giardia* stwierdzono w 36 próbkach (45,6%), a obecność oocyst *Cryptosporidium* w 26 próbkach (32,9%). Stopień zanieczyszczenia próbek wody *Giardia* i *Cryptosporidium* wykazywał znaczne zróżnicowanie w zależności od odległości od żeremii. Liczba wykrywanych cyst *Giardia* znacznie malała wraz z odległością od żeremii bobrów, natomiast liczba stwierdzanych w próbkach *Cryptosporidium* nie wykazywała takiej zależności. Liczba cyst *Giardia* stwierdzana w próbkach wody pobranych wiosną była blisko 3 razy większa niż w próbkach wody pobranych jesienią. Natomiast w przypadku *Cryptosporidium*, większą liczbę oocyst wykryto w próbkach pobranych jesienią niż wiosną. DNA *Giardia* stwierdzono w 38 próbkach (48,1%), natomiast DNA *Cryptosporidium* stwierdzono tylko w 7 próbkach (8,9%). Analiza sekwencyjna i/lub RFLP PCR wykazała obecność w próbkach wody zoonotycznych genotypów A i B *Giardia*. Podsumowując, woda w pobliżu żeremii bobrów w badanym regionie była zanieczyszczona (oo)cystami *Giardia duodenalis* i *Cryptosporidium* spp., co potwierdza opinię innych autorów o potencjalnej roli bobrów jako rezerwuaru tych pasożytów i wskazuje na potrzebę wdrożenia odpowiednich działań prewencyjnych, zwłaszcza w rejonach uczęszczanych turystycznie.

Jednym ze źródeł pasożytów *Cryptosporidium* spp. i *Giardia duodenalis* mogą być ścieki odprowadzane z oczyszczalni ścieków do wód powierzchniowych. Stąd kolejnym etapem moich badań była ocena stopnia zanieczyszczenia tymi pasożytami ścieku oczyszczonego. Próbki ścieku oczyszczonego, pobierano z 13 komunalnych oczyszczalni ścieków (OŚ) zlokalizowanych we wschodniej Polsce. Oocysty *Cryptosporidium* i cysty *Giardia* izolowano z próbek ścieku metodą immunomagnetycznej separacji, a następnie identyfikowano z użyciem DFA, nested PCR i Real time PCR (RT). Żywotność pierwotniaków dla wybranych próbek określano podczas badania mikroskopowego, po wcześniejszym wybarwieniu preparatów z użyciem zestawu Live / Dead BacLight, (Invitrogen). W DFA oocysty *Cryptosporidium* spp. wykryto w próbkach z 8 OŚ (61,5%), natomiast cysty *Giardia* w próbkach z 11 OŚ (84,6%). Obydwa patogeny wykryto w próbkach z 7 OŚ. Średnia koncentracja oocyst *Cryptosporidium* i cyst *Giardia* w próbkach z 13 oczyszczalni wynosiła odpowiednio 28,5 / l i 113,6 / l ścieku. W nested PCR i RT PCR DNA *Giardia* wykryto w próbkach, odpowiednio z 4 (30,8%) i 5 oczyszczalni (38,5%), natomiast w przypadku *Cryptosporidium* uzyskano jedynie 1 wynik wątpliwy w RT. Żywe (oo)cysty *Cryptosporidium* i *Giardia* stwierdzono w 3 z 4 wyselekcjonowanych próbek, odpowiednio w zakresach: 12,5% - 60,0% i 50-100% w odniesieniu do wszystkich wykrytych (oo)cyst.

Uzyskane wyniki świadczą o ryzyku kontaminacji poprzez ścieki, wód powierzchniowych żywymi pasożytami z rodzaju *Cryptosporidium* i *Giardia* i konieczności wdrożenia dodatkowych procedur oczyszczania ścieków.

Poniżej przedstawiono publikacje dotyczące tego kierunku badań:

1. **Sroka J**, Stojcki K, Zdybel J, Karamon J, Cencek T, Dutkiewicz J. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in effluent from sewage treatment plant from eastern Poland. *Ann Agric Environ Med*. 2013; Special Issue 1: 57–62.
2. **Sroka J**, Gizejewski Z, Wójcik-Fatla A, Stojcki K, Bilska-Zajac E, Dutkiewicz J, Cencek T, Karamon J, Zajac V, Kusyk P, Dąbrowska J, Kochanowski M. Potential role of beavers (*Castor fiber*) in contamination of water in the Masurian Lake District (north-eastern Poland) with protozoan parasites *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. *Bull Vet Inst Pulawy*. 2015, 59, 219-228.
3. **Sroka J**, Karamon J, Cencek T. Kryptosporidioza – pasożytnicza zoonoza. *Życie Wet*. 2009, 6, 476-479.
4. Stojcki K, **Sroka J**, Karamon J, Kusyk P, Cencek T. Influence of selected stool concentration techniques on the effectiveness of PCR examination in *Giardia intestinalis* diagnostics *Pol J Vet Sci*. 2014, 17, 19-25.
5. Stojcki K, **Sroka J**, Cencek T, Dutkiewicz J. Epidemiological survey in Łęczyńsko-Włodawskie Lake District of eastern Poland reveals new evidence of zoonotic potential of *Giardia intestinalis*. *Ann Agric Environ Med*. 2015, 22, 594-598.
6. Stojcki K., **Sroka J.**, Caccio S., Cencek T., Dutkiewicz J., Kusyk P.: Prevalence and molecular typing of *Giardia duodenalis* in wildlife from eastern Poland. *Folia Parasitol* 2015, DOI: 10.14411/fp.2015.042.
7. Plutzer J., Lassen B., Jokelainen P., Djurković-Djaković O., Kucsera I., Dorbek-Kolin E., Šoba B., Sréter T., Imre K., Omeragić J., Nikolić A., Bobić B., Živičnjak T., Lučinger S., Stefanović L., Kučinar J., **Sroka J.**, Dekšne G., Keidāne D., Kváč M., Hůzová Z., Karanis P.: Review of *Cryptosporidium* and *Giardia* in the eastern part of Europe, 2016. *Euro Surveill*. 2018, 23(4): pii=16-00825. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.4.16-00825>

Ocena narażenia wybranych grup ludności na kontakt z patogenami zoonotycznymi

Zagadnienia związane z epidemiologią chorób odzwierzęcych, ze szczególnym uwzględnieniem toksoplazmozy i jej potencjalnych źródeł zarażenia, były przedmiotem mojego zainteresowania od początku mojej pracy. Prowadzone badania dotyczyły przede wszystkim rejonu Lubelszczyzny i obejmowały badania ludzi, zwierząt i środowiska.

Badania w kierunku toksoplazmozy były oparte o wyniki badań laboratoryjnych oraz dane z wywiadu epidemiologicznego. W ramach pracy wykazano przypadki toksoplazmozy o charakterze rodzinno-środowiskowym, związane z istnieniem przypuszczalnie, wspólnego źródła zarażenia dla mieszkańców badanych gospodarstw (Sroka, 1999; Sroka i Szymańska, 2012; Sroka i wsp., 2006). Stwierdzano również przypadki toksoplazmozy o charakterze zawodowym (Sroka, 2004). Znaczną seroprewalencję stwierdzono wśród pracowników zakładów mięsnych (do 77%) (Sroka i wsp., 2003), leśników (do 89,5%) (Sroka, 2001) i rolników (66,9%) (Sroka i wsp., 2010) oraz nieco niższą u myśliwych (38,5%) (Tokarska-Rodak i wsp., 2018). W niektórych rejonach woj. lubelskiego wykazano istnienie terenów endemicznych dla toksoplazmozy, na których stwierdzano wysokie odsetki wyników seropozytywnych zarówno wśród ludzi jak i hodowanych tam zwierząt. Na tych terenach notowano również przypadki kliniczne toksoplazmozy. Badania seroepidemiologiczne prowadzone wśród osób potencjalnie narażonych na kontakt z pasożytem wykazywały istotną korelację między ich seropozytywnością w kierunku *T. gondii* a wykazywanym w wywiadzie ich częstym kontaktem ze zwierzętami gospodarskimi oraz surowymi tkankami, wydzielinami i

wydalinami zwierząt, a także konsumpcją surowego mleka koziego, surowej wody ze studni przydomowych i konsumpcją surowego mięsa (Sroka, 1999; Sroka, 2001; Sroka i wsp., 2010). W ramach badań na terenie jednego z gospodarstw wiejskich w rejonie Sobiboru, w którym w przeszłości u jednego z mieszkańców zdiagnozowano postać kliniczną toksoplazmozy, izolowano żywy szczep *T. gondii* z tkanek hodowanego tam królika (Sroka i wsp., 2003).

Uczestniczyłem również w badaniach oceniających seroprewalencję w kierunku bakterii z rodzaju *Rickettsia* wśród grupy osób zawodowo narażonych na pokłucie przez kleszcze (rolnicy, leśnicy). Ogólny odsetek wyników dodatnich wyniósł 36,0% i był istotnie wyższy w porównaniu do grupy kontrolnej (4.7%). Przeciwciała anty-*Rickettsia* stwierdzono u ponad połowy badanych leśników (50.4%) oraz u 21.3% rolników (Zajac i wsp., 2013).

Brałem także udział w badaniach mających na celu określenie sytuacji seroepidemiologicznej dotyczącej leptospirozy u mieszkańców terenów popowodziowych. W tym celu badano 100 losowo wybranych osób, zamieszkujących obszar dotknięty powodzią (A) (północno-zachodnia części województwa lubelskiego nad brzegiem Wisły, powódź w 2010 r.) oraz 98 osób z terenu nie zagrożonego powodzią (B), na terenie Lubelszczyzny. Badania serologiczne na określenie 18 serowarów *Leptospira* wykonano przy użyciu testu aglutynacji mikroskopowej. Jak wykazały wyniki badań, seroprewalencja wśród mieszkańców z terenu „A” była niższa niż mieszkańców z terenu „B” (odpowiednio 3,0% i 9,2%), co wstępnie sugeruje, że istnieje tylko niewielkie zagrożenie epidemią leptospirozy po powodzi, która dotknęła wschodnią Polskę (Wasiński i wsp., 2012; Dutkiewicz i wsp. 2015).

W ramach kolejnej działalności, prowadzone były badania rolników na obecność swoistych przeciwciał anty *Echinococcus granulosus* i anty *E. multilocularis*. U 12.8% badanych rolników uzyskano wyniki seropozytywne, natomiast wśród grupy kontrolnej (mieszkańcy miast) nie stwierdzono przeciwciał (Cisak i wsp., 2015). Kilka prowadzonych badań dotyczyło oceny występowania zakażenia kleszczowego zapalenia mózgu i boreliozy wśród rolników i pracowników leśnictwa z terenu Lubelszczyzny (Cisak i wsp., 1996; 1997; 1999; 2012)

Kolejne badania dotyczyły oceny ryzyka występowania wybranych zakażeń odzwierzęcych w grupie zawodowej lekarzy weterynarii w Polsce (2017-2018). Grupę 373 pracowników weterynarii badano serologicznie (ELISA) w kierunku *Toxoplasma gondii*, *Leptospira* spp., *Coxiella burnetii* i *Echinococcus granulosus*. Wyniki seropozytywne w kierunku *T. gondii*, *Coxiella burnetii* i *Leptospira* spp. stwierdzono odpowiednio u: 44,5%, 4,3% i 16,9% osób. Nie stwierdzono wyników seropozytywnych w kierunku *Echinococcus granulosus* (Wójcik-Fatla i wsp., 2018a). W kolejnych badaniach wśród tej grupy zawodowej, oceniano narażenie na pasożytnicze pierwotniaki z rodzaju *Giardia duodenalis* i *Cryptosporidium* spp.. Badano próbki kału uzyskane od 297 osób. Wyniki dodatnie w DFA i PCR, potwierdzające obecność cyst *Giardia*, uzyskano dla 2 próbek kału (0,67%). Analiza sekencyjna produktów amplifikacji wykazała obecność genotypu A (sub-genotyp A3) *Giardia duodenalis*. W DFA, w badanych próbkach nie stwierdzono obecności *Cryptosporidium*. W oparciu o uzyskane wstępne wyniki badań, można wnioskować, że ryzyko zarażenia *Giardia duodenalis* i *Cryptosporidium* spp. w

odniesieniu do grupy zawodowej lekarzy weterynarii wydaje się być niskie (Wójcik-Fatla i wsp., 2018b).

Poniżej przedstawiono publikacje dotyczące tego kierunku badań:

1. **Sroka J**: Przypadek toksoplazmozy rodzinno-środowiskowej. *Med Ogólna*. 1999, 5, 307-313.
2. **Sroka J**, Szymańska J.: Analysis of prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in selected rural households in the Lublin region. *Bull Vet Inst Pulawy*. 2012, 56, 529-534.
3. **Sroka J**, Wójcik-Fatla A, Dutkiewicz J. Occurrence of *Toxoplasma gondii* in the water from wells located on farms. *Ann Agric Environ Med*. 2006, 13, 169-175.
4. **Sroka J**, Zwoliński J, Dutkiewicz J. The prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies among abattoir workers in Lublin. *Wiad Parazyt*. 2003, 49, 47-55.
5. **Sroka J.**: Seroepidemiology of toxoplasmosis in the Lublin region. *Ann Agric Environ Med*. 2001, 8, 25-31.
6. **Sroka J.**, Wójcik-Fatla A., Szymańska J., Dutkiewicz J., Zajac V., Zwoliński J. Occurrence of *Toxoplasma gondii* infection in people and animals from rural environment of Lublin region – estimate of potential role of water as a source of infection. *Ann Agric Environ Med*. 2010, 17, 125-132.
7. Tokarska-Rodak M, Weiner M, Szymańska-Czerwińska M, Pańczuk A, Niemczuk K, **Sroka J**, Różycki M, Iwaniak W: Seroprevalence of selected zoonotic agents among hunters from Eastern Poland. *Pol J Microbiol*. 2018, 67, 233–236. DOI: 10.21307/pjm-2018-027
8. **Sroka J**, Zwoliński J, Dutkiewicz J, Toś-Luty S, Latuszyńska J. Toxoplasmosis in rabbits confirmed by strain isolation: A potential risk of infection among agricultural workers. *Ann Agric Environ Med*. 2003, 10, 125-128.
9. Zajac V, Wójcik-Fatla A, Cisak E, **Sroka J**, Sawczyn A, Dutkiewicz J. Study on tick-borne rickettsiae in eastern Poland: II. Serological response of the occupationally exposed populations. *Ann Agric Environ Med*. 2013, 20, 2, 280-282.
10. Wasiński B, **Sroka J**, Wójcik-Fatla A, Zajac V, Cisak E, Knap JP, Sawczyn A, Dutkiewicz J. Seroprevalence of leptospirosis in rural populations inhabiting areas exposed and not exposed to floods in eastern Poland. *Ann Agric Environ Med*. 2012, 19, 285-288.
11. Dutkiewicz J, Wójcik-Fatla A, Zajac V, Wasiński B, Knap PJ, **Sroka J**, Cisak E, Sawczyn A: Ocena narażenia populacji wiejskiej Lubelszczyzny na zakażenie krętkami z rodzaju *Leptospira*, ze szczególnym uwzględnieniem terenów popowodziowych. *Med Og Nauk Zdr*. 2015, 21(1): 65–70.
12. Cisak E, **Sroka J**, Wójcik-Fatla A, Zajac V, Dutkiewicz J: Evaluation of reactivity to *Echinococcus* spp. among rural inhabitants in Poland. *Acta Parasitol*. 2015, 60, 525-530.
13. Cisak E, Umiński J, **Sroka J**. Kolejne ognisko endemiczne kleszczowego zapalenia mózgu. Wyniki badań seroepidemiologicznych w roku 1995 w makroregionie lubelskim. *Med Ogólna*. 1996, 1, 70-74.
14. Cisak E, Umiński J, **Sroka J**, Zwoliński J. Badania seroepidemiologiczne w kierunku kleszczowego zapalenia mózgu na terenie makroregionu lubelskiego (1994-1996). *Med Ogólna*. 1997, 3, 388-394.
15. Cisak E, **Sroka J**, Zwoliński J, Chmielewska-Badora J. Ocena narażenia na zakażenie wirusem kleszczowego zapalenia mózgu osób zawodowo ekspozowanych na kontakt z kleszczami. *Wiad Parazytol*. 1999, 45, 375-380.
16. Cisak E, Wójcik-Fatla A, Zajac V, **Sroka J**, Dutkiewicz J. Risk of Lyme disease at various sites and workplaces of forestry workers in eastern Poland. *Ann Agric Environ Med*. 2012, 19, 465-468.
17. Wójcik-Fatla A, **Sroka J**, Zajac V, Zwoliński J, Sawczyn-Domańska A, Kloc A, Bilska-Zajac E, Chmura R, Dutkiewicz J. Study on *Toxoplasma gondii*, *Leptospira* spp., *Coxiella burnetii*, and *Echinococcus granulosus* infection in veterinarians from Poland. *J Vet Res*. 2018a, 62, 477-483. DOI: 10.2478/jvetres-2018-0069.
18. Wójcik-Fatla A, **Sroka J**, Zajac V, Zwoliński J, Dutkiewicz J. Study on *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. infection in veterinarians in Poland. *Ann Agric Environ Med*. 2018b, 25, 732–733. doi: 10.26444/aaem/101576

Choroby transmisyjne – wektory i potencjalne źródła zakażenia

Choroby transmisyjne stanowią ważną grupę chorób zakaźnych w rozprzestrzenianiu których ważną rolę spełniają przenoszące drobnoustroje wektory. Takim wektorem wielu patogenów stanowiących zagrożenie zdrowia dla ludzi i zwierząt są kleszcze. Ten kierunek moich badań obejmował ocenę występowania w kleszczach z gatunku *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus*, patogenów o znaczeniu zoonotycznym: *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. Patogeny identyfikowano w oparciu o badanie PCR i analizę sekwencyjną. Jednym z kolejnych kierunków badań była ocena występowania bakterii *Leptospira* spp. w kleszczach bytujących na wybranych terenach Lubelszczyzny: popowodziowych (gmina Wilków) i na terenach nie dotkniętych powodzią (gmina Dąbrowa). Ogólny odsetek kleszczy *Ixodes ricinus* zakażonych *Leptospira* spp. wyniósł 10,5%. Częstość występowania DNA *Leptospira* spp. w kleszczach była większa wśród kleszczy zebranych z terenów popowodziowych niż z terenów kontrolnych (odpowiednio 15,6% i 1,4%, $P < 0.0001$) (Wójcik-Fatla i wsp., 2012). W badaniach nad koinfekcjami u kleszczy z gatunku *Dermacentor reticulatus* oceniano współwystępowanie 6 patogenów: *Babesia* spp, *Rickettsia raoultii*, TBEV, *Borrelia burgdorferi* s. l., *Toxoplasma gondii* i *Anaplasma phagocytophilum*. Największy odsetek koinfekcji dwóch patogenów dotyczył *Rickettsia raoultii* (7,4%) i wirusa KZM (5,21%), niższe odsetki dotyczyły współzarażeń z udziałem *Toxoplasma gondii* (1,58%) i współzakażeń z *Borrelia burgdorferi* s. l. (1,26%), *Anaplasma phagocytophilum* (0,95%) i *Babesia* spp. (0,63%) (Zając i wsp., 2017). W innych badaniach, oceniano występowanie bakterii *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s. l.) w kleszczach *Ixodes ricinus* na terenie woj. lubelskiego. Obecność krętków *Borrelia* stwierdzono u 12,7% kleszczy. Najwyższy odsetek zakażeń stwierdzono u samic (19,7%), niższy u samców (13,7%) i najniższy w nimfach (7,1%). Większość zainfekowanych kleszczy pochodziło z Dąbrowy (k. Lublina) (22,6%), natomiast najmniej zakażonych kleszczy było z Pojezierza Łęczyńsko-Włodawskiego (4,6%). W miejscowościach Piotrowice i w Poleskim Parku Narodowym odsetki kleszczy zakażonych *B. burgdorferi* sensu lato były zbliżone i wynosiły: 10,1% i 13,0%. (Sroka i wsp., 2009). W innych badaniach oceniano występowanie bakterii *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s. l.) w kleszczach *Ixodes ricinus* na terenie Lubelszczyzny. Stwierdzono wyraźną tendencję wzrostową w infekcjach kleszczy krętkami *Borrelia*, od 6,0% w latach 2008-2009, do 15,3% w latach 2013-2014 ($P < 0.0001$). Najczęściej stwierdzanym genogatunkiem był *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (44% ogółu wyników dodatnich), następnie *Borrelia garinii* (31,1%) i *Borrelia afzelii* (24,9%). Stwierdzono również tendencję wzrostową w występowaniu koinfekcji u kleszczy (obecność w kleszczu 2 lub więcej genogatunków) od 21,4% do 49,2%. Dane te wskazują na rosnące ryzyko zachorowań na boreliozę we wschodniej Polsce, zwłaszcza wśród osób zawodowo narażonych (np. leśników) lub przebywających rekreacyjnie na terenach leśnych (Wójcik-Fatla i wsp., 2016). Celem kolejnych badań była ocena występowania bakterii *Francisella tularensis* oraz określenie potencjalnej roli kleszczy jako rezerwuaru *Francisella*-like endosymbionts. Wśród badanych 530 kleszczy *Dermacentor reticulatus* oraz 861 kleszczy *Ixodes ricinus* z terenu

województwa lubelskiego wynik dodatni na obecność *Francisella tularensis* stwierdzono tylko u 1 kleszcza (0,2%), co świadczy o niskim ryzyku zachorowania na tularamię w wyniku pokłucia przez kleszcze. Jednocześnie jednak u ponad połowy kleszczy *Dermacentor reticulatus* (50,4%) stwierdzono *Francisella*-like endosymbionts (FLEs). Wg dostępnej wiedzy, były to pierwsze badania w Polsce, w których wykazano w kleszczach *Dermacentor reticulatus* obecność *F. tularensis* podtyp *holarctica* i *Francisella*-like endosymbionts (FLEs) (Wójcik-Fatla i wsp., 2015b). Celem innych badań było określenie występowania *Rickettsia* spp. w kleszczach *Dermacentor reticulatus* we wschodniej Polsce. Wśród badanych 528 kleszczy u 53% stwierdzono obecność *Rickettsia* spp. Wyniki uzyskanych badań wskazują, że kleszcze *D. reticulatus* mogą być potencjalnym wektorem i rezerwuarem bakterii *Rickettsia* spp (Wójcik-Fatla i wsp., 2013).

Uczestniczyłem również w badaniach nad rozprzestrzenieniem bakterii z rodzaju *Leptospira* na obszarze popowodziowym oraz nie dotkniętym powodzią (kontrolnym) w woj. lubelskim. Wśród badanych próbek wody i gleby pobranych z obydwu terenów badań, DNA *Leptospira* stwierdzono jedynie w próbkach wody z terenów popowodziowych (5.0%), nie stwierdzono tych bakterii w próbkach gleby. Uzyskane wyniki wskazują pośrednio na istotną rolę wody w utrzymywaniu się *Leptospira* spp. w środowisku (Wójcik-Fatla i wsp. 2014).

Badania, w których brałem udział, dotyczyły również próby identyfikacji patogenów odkleszczowych u zwierząt gospodarskich i wolno żyjących, a także w produktach pochodzenia zwierzęcego. Obecność przeciwciał anty TBEV stwierdzono u 4.1% badanego bydła, 16,8% dzików i u 11.6% jeleniowatych (Cisak i wsp., 2012). Badano również próbki tkanek drobnych gryzoni z terenu Lubelszczyzny na obecność hantawirusów. Obecność hantawirusów wykryto u 8,3% zwierząt, pochodzących z terenów popowodziowych (Wójcik-Fatla i wsp. 2013a). W kolejnych badaniach, próbki tkanek drobnych ssaków z terenu Lubelszczyzny badano na obecność *Leptospira* spp. DNA tych bakterii stwierdzono ogółem u 25% badanych ssaków (Wójcik-Fatla i wsp. 2013b). Natomiast w innych badaniach, obecność DNA TBEV stwierdzono w 22.2% próbek mleka owczego, 20.7% mleka koziego i 11.1% mleka krowiego (Cisak i wsp. 2010). Z kolei w badaniach próbek mleka od krów, kóz i owiec metodą PCR, DNA *T. gondii* stwierdzono w 15,9% próbek mleka krowiego, w 1 próbce mleka koziego (3,4%) i w jednej próbce mleka owczego (3,7%). Żadna z badanych próbek nie wykazała obecności DNA *A. phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. i *Coxiella burnetii* (Cisak i wsp., 2016).

Podsumowując, uzyskane wyniki potwierdzają istotną rolę kleszczy jako rezerwuaru i wektora wielu patogenów zoonotycznych, wskazują także na ważną rolę zwierząt oraz elementów środowiska jako potencjalnych źródeł zakażenia dla człowieka.

Poniżej przedstawiono publikacje dotyczące tego kierunku badań:

1. Wójcik-Fatla A, Zając V, Cisak E, **Sroka J**, Sawczyn A, Dutkiewicz J. Leptospirosis as a tick-borne disease? Detection of *Leptospira* spp. in *Ixodes ricinus* ticks in eastern Poland. Ann Agric Environ Med. 2012, 19, 656-659.
2. Zając V, Wójcik-Fatla A, Sawczyn A, Cisak E, **Sroka J**, Kloc A, Zając Z, Buczek A, Dutkiewicz J, Bartosik K. Prevalence of infections and co-infections with 6 pathogens in *Dermacentor reticulatus* ticks collected in eastern Poland. Ann Agric Environ Med. 2017, 24, 26–32.

DOI: 10.5604/12321966.1233893.

3. **Sroka J**, Szymańska J, Wójcik-Fatla A. The Occurrence of *Toxoplasma gondii* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from east Poland with the use of PCR. *Ann Agric Environ Med*. 2009, 16, 313-319.
4. Wójcik-Fatla A, Zając V, Sawczyn A, **Sroka J**, Cisak E, Dutkiewicz J: Infections and mixed infections with the selected species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex in *Ixodes ricinus* ticks collected in eastern Poland: a significant increase in the course of 5 years. *Exp Appl Acarol*. 2016, 68, 197-212. doi: 10.1007/s10493-015-9990-4
5. Wójcik-Fatla A, Zając V, Sawczyn A, Cisak E, **Sroka J**, Dutkiewicz J. Occurrence of *Francisella* spp. in *Dermacentor reticulatus* and *Ixodes ricinus* ticks collected in eastern Poland. *Ticks Tick Borne Dis*. 2015, 6, 253-257. (Open access: doi:10.1016/j.ttbdis.2015.01.005)
6. Wójcik-Fatla A, Cisak E, Zając V, **Sroka J**, Sawczyn A, Dutkiewicz J. Study on tick-borne rickettsiae in eastern Poland. I. Prevalence in *Dermacentor reticulatus* (Acari: Amblyommidae). *Ann Agric Environ Med*. 2013, 20, 276-279.
7. Wójcik-Fatla A, Zając V, Wasiński B, **Sroka J**, Cisak E, Sawczyn A, Dutkiewicz J. Occurrence of *Leptospira* DNA in water and soil samples collected in eastern Poland. *Ann Agric Environ Med*. 2014, 21, 730-732.
8. Cisak E, Wójcik-Fatla A, **Sroka J**, Zając V, Bilska-Zając E, Chmurzyńska E, Dutkiewicz J. Prevalence of tick-borne encephalitis virus antibodies in domestic and game animals from eastern Poland. *Bull Vet Inst Pulawy*. 2012, 56, 275-278.
9. Wójcik-Fatla A, Zając V, Knap JP, **Sroka J**, Cisak E, Sawczyn A, Dutkiewicz J. A small-scale survey of hantavirus in mammals from eastern Poland. *Ann Agric Environ Med*. 2013a, 20, 283-286.
10. Wójcik-Fatla A, Zając V, **Sroka J**, Piskorski M, Cisak E, Sawczyn A, Dutkiewicz J. A small scale survey of *Leptospira* in mammals from eastern Poland. *Ann Agric Environ Med*. 2013b, 20, 705-707.
11. Cisak E, Wójcik-Fatla A, Zając V, **Sroka J**, Buczek A, Dutkiewicz J. Prevalence of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in the samples of raw milk taken randomly from cows, goats and sheep in eastern Poland. *Ann Agric Environ Med*. 2010, 17, 283-286.
12. Cisak E, Zając V, **Sroka J**, Sawczyn A, Kloc A, Dutkiewicz J, Wójcik-Fatla A. Presence of pathogenic *Rickettsiae* and protozoan in samples of raw milk from cows, goats, and sheep. *Foodborne Pathog Dis*. 2017, 14, 189-194 doi: 10.1089/fpd.2016.2203.

Diagnostyka zarażenia *T. gondii* u kobiet w ciąży. Toksoplazmoza wrodzona u płodu jest zwykle wynikiem pierwotnej inwazji *T. gondii* u kobiety podczas ciąży. Stąd ustalenie statusu immunologicznego kobiety w ciąży, a tym samym określenie fazy zarażenia, ma istotne znaczenie w ewentualnym postępowaniu terapeutycznym. W oparciu o stwierdzone na podstawie badań serologicznych obraz immunologiczny (obecność lub brak swoistych przeciwciał klasy IgM, IgG, ocena awidności p-ciał IgG) określana jest faza inwazji. Postępowanie terapeutyczne może być skuteczne jedynie w początkowej fazie inwazji. Markerami ostrej fazy zarażenia *T. gondii* są m.in. swoiste przeciwciała klasy IgM, jak również niska awidność przeciwciał klasy IgG. Rutynowo stosowany w laboratoriach test do oceny awidności IgG (ELFA IgG Avidity, bioMerieux) pozwala z dużym prawdopodobieństwem potwierdzić przewlekłą fazę inwazji (wysoka awidność) i ze znacznie mniejszą pewnością - ostrą fazę (niska awidność). Ponadto, istnieje możliwość zafałszowania obrazu immunologicznego np. poprzez obecność przetrwałych p-ciał klasy

IgM, stąd określenie fazy inwazji w oparciu o rutynowo stosowane techniki może prowadzić do fałszywych wniosków. Dlatego istotne jest stosowanie w diagnostyce toksoplazmozy uznanych metod referencyjnych jak np. metody Western blot, w której, dzięki jednoczesnemu zastosowaniu szeregu rekombinowanych antygenów, zwiększa się wiarygodność oceny statusu immunologicznego pacjenta.

Celem badań własnych była ocena przydatności do rutynowej diagnostyki toksoplazmozy metody Western blot (WB), która może pozwolić na bardziej dokładną ocenę fazy zarażenia w oparciu o specyfikę wiązania się poszczególnych klas przeciwciał z różnymi antygenami eksponowanymi w kolejnych fazach inwazji. W celu określenia statusu immunologicznego badanych osób w kierunku *T. gondii* próbki surowic badano na obecność przeciwciał anty-*T. gondii* klasy IgM i IgG przy użyciu testów ELFA Vidas Toxo IgM i Vidas Toxo IgG oraz aparatu miniVidas, firmy bioMerieux. Dla surowic dodatnich w kierunku IgG *T. gondii* wykonano badanie na awidność przeciwciał IgG *T. gondii* przy użyciu zestawu Vidas Toxo awidności IgG i aparatu miniVidas (bioMerieux). Następnie te same próbki surowic badano na obecność przeciwciał anty-*T. gondii* klasy IgM i IgG przy użyciu techniki WB (zestawy komercyjne: recomLine *Toxoplasma* IgG i recomLine *Toxoplasma* IgM firmy Mikrogen). Wykonano również badania awidności przeciwciał klasy IgG przy użyciu testu recomLine *Toxoplasma* IgG (Avidity) firmy Mikrogen. Po wykonaniu badań przeprowadzono analizę porównawczą wyników uzyskanych w WB (ocena wiązania się poszczególnych klas przeciwciał z określonymi antygenami charakterystycznymi dla faz zarażenia: ROP1 (66 kDa), MAG1 (65 kDa), SAG1 (30 kDa), GRA7 (29 kDa), GRA8 (35 kDa) z wynikami metody ELFA (IgM, IgG, awidność IgG). Na podstawie przeprowadzonej analizy, stwierdzono wysoką zgodność jakościową (97,5%) wyników pozytywnych w klasie p-ciał IgG uzyskanych w testach ELFA i WB. Wykazano jednocześnie znaczne różnice w wynikach badania na obecność p-ciał klasy IgM przy zastosowaniu obydwu technik. Uzyskane wyniki badań własnych mogą wskazywać na wyższą czułość i specyficzność metody ELFA w detekcji przeciwciał anty *T. gondii* klasy IgM w porównaniu do WB. Natomiast, większe możliwości techniki WB w porównaniu do techniki ELFA wykazano w zakresie oceny awidności przeciwciał klasy IgG i tym samym większą precyzyjność WB w określeniu fazy zarażenia.

Poniżej przedstawiono publikację dotyczące tego kierunku badań:

Sroka J, Wójcik-Fatla A, Zając V, Sawczyn A, Cisak E, Karamon J, Dutkiewicz J, Bojar I. Comparison of the efficiency of two commercial kits - ELFA and Western blot in estimating the

phase of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. Ann Agric Environ Med. 2016, 23, 570-575.
doi: 10.5604/12321966.1226848.

Pozostałe kierunki badań

W ramach pracy w Zakładzie Parazytologii i Chorób Inwazyjnych uczestniczyłem w badaniach nad występowaniem tasiemców *E. multilocularis* u lisów w Polsce, które wykazały zróżnicowaną w zależności od rejonu kraju prevalencję tego pasożyta, od kilku procent w zachodnich województwach do nawet 50% na niektórych terenach Polski wschodniej (Karamon i wsp., 2014). W ramach badań nad występowaniem *E. multilocularis*, po raz pierwszy w Polsce wykazano inwazję tego pasożyta u psów oraz obecność form larwalnych *E. multilocularis* u świń (Karamon i wsp., 2012; Karamon i wsp., 2016). Innym kierunkiem badań, w których uczestniczyłem, były prace nad wyznaczeniem granicy wykrywalności w metodach sedymentacyjnych: SCT (sedimentation and counting technique) i IST (intestinal scraping technique), służących do detekcji *E. multilocularis* w treści jelit. Pomimo powszechności stosowania tych metod w badaniach monitoringowych lisów, dotychczas czułość tych metod była określana jedynie na podstawie teoretycznych założeń. W oparciu o wyniki przeprowadzonych badań granica wykrywalności (LD₅₀) metody SCT i IST została ustalona odpowiednio na poziomie 10 i 50 tasiemców na próbkę, potwierdzając wysoką skuteczność zwłaszcza metody SCT (Karamon i wsp., 2010; Karamon i wsp., 2012). W ramach pracy, uczestniczyłem także w badaniach dotyczących wykorzystania czytnika ELISA do odczytu wyników OWD (Cencek i wsp., 2008). Brałem ponadto udział w pracach, których celem była ocena występowania *Trichinella* spp. u dzików. W badaniach tych, po raz pierwszy w Polsce stwierdzono przypadki inwazji *Trichinella nativa* jak również *T. pseudospiralis* u dzików (Bilska-Zajac i wsp., 2016a; 2017). Uczestniczyłem także w badaniach dot. występowania *Anisakis simplex* w łososiach (Bilska-Zajac i wsp., 2016b). Brałem również udział w pracach dotyczących diagnostyki serologicznej gzwicy bydła (*Hypoderma bovis*) oraz analizy struktury enzymów larw tego pasożyta (Cencek i wsp., 2009; Cencek i wsp., 2012). Byłem zaangażowany w badania dotyczące oporności ptaszyńców (*Dermanyssus galline*) na różne rodzaje akaricydów, a także w opracowaniu metody służącej ocenie *in vitro* skuteczności tych środków (Cencek i wsp., 2011). Uczestniczyłem w optymalizacji metod PCR do identyfikacji form rozwojowych tasiemców *Taenia solium*. Jak wykazano, najlepszą czułością i specyficznością charakteryzowała się metoda nested PCR, oparta na amplifikacji genu kodującego białko Tso3 (Karamon i wsp., 2013).

Poniżej lista wybranych publikacji związanych z opisaną w tym akapicie tematyką badawczą:

1. Karamon J, Kochanowski M, **Sroka J**, Cencek T, Rozycki M, Chmurzynska E, Bilska-Zajac E. The prevalence of *Echinococcus multilocularis* in red foxes in Poland-current results (2009-2013). Parasitol Res. 2014, 113, 317-322

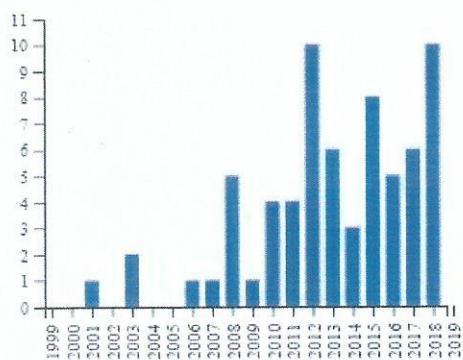
2. Karamon J, Samorek-Pieróg M, Kochanowski M, Dąbrowska J, **Sroka J**, Gołąb E, Umhang G, Cencek T. First detection of *Echinococcus multilocularis* in dogs in a highly endemic area of Poland. *Folia Parasitol.* 2016, 63, 018.
3. Karamon J, **Sroka J**, Cencek T. The first detection of *Echinococcus multilocularis* in slaughtered pigs in Poland. *Vet Parasitol.* 2012, 185, 327-329.
4. Karamon J, **Sroka J**, Cencek T. Limit of detection of sedimentation and counting technique (SCT) for *Echinococcus multilocularis* diagnosis, estimated under experimental conditions. *Exp Parasitol.* 2010, 124, 244-246.
5. Karamon J, **Sroka J**, Cencek T, Kochanowski M, Dąbrowska J. Efficacy of intestinal scraping technique (IST) in *Echinococcus multilocularis* diagnosis – estimation of the limit of detection and comparison with sedimentation and counting technique (SCT). *Bull Vet Inst Pulawy.* 2012, 56, 535–538.
6. Cencek T, Karamon J, Ziomko I, **Sroka J**. Application of ELISA reader in complement fixation test used for dourine diagnosis. A preliminary study. *Bull Vet Inst Pulawy.* 2008, 3, 363-368.
7. Bilska-Zajac E, Rozycki M, Chmurzynska E, Antolak E, Próchniak M, Grądział-Krukowska K, Karamon J, **Sroka J**, Zdybel J, Cencek T. First case of *Trichinella native* infection in wild boar in Central Europe - molecular characterization of the parasite. *Parasitol Res.* 2017, 116, 1705-1711.
8. Bilska-Zajac E, Rozycki M, Chmurzynska E, Karamon J, **Sroka J**, Antolak E, Próchniak M, Cencek T. First record of wild boar infected with *Trichinella pseudospiralis* in Poland. *J Vet Res.* 2016a, 60, 147-152.
9. Bilska-Zajac E, Lalle M, Rozycki M, Chmurzyńska E, Kochanowski M, Karamon J, **Sroka J**, Pozio E, Cencek T. High prevalence of *Anisakidae* larvae in marketed frozen fillets of pink salmon (*Oncorhynchus gorbusha*). *Food Control.* 2016b, 68, 216-219.
10. Cencek T, Karamon J, **Sroka J**, Zdybel J. Rola hypodermin w przystosowaniu larw gzów bydłych do pasożytniczego trybu życia. *Medycyna Wet.* 2009, 65, 593-596.
11. Cencek T, Karamon J, **Sroka J**, Zdybel J. Modified method of *Hypoderma bovis* proteins transfer from gel obtained by native electrophoresis onto nitrocellulose membrane. *Bull Vet Inst Pulawy.* 2012, 56, 547-552.
12. Cencek T, Karamon J, **Sroka J**, Zdybel J. New in vitro method for determination of acaricide efficiency against *Dermanyssus gallinae* mites. *Bull Vet Inst Pulawy.* 2011, 55, 657-662.
13. Karamon J, **Sroka J**, Cencek T, Różycki M, Chmurzyńska E, Bilska-Zajac E, Zdybel J, Nowak P, Kędzierska J, Dębiak P. Optimisation and comparison of three PCR procedures for molecular identification of *Taenia solium*. *Bull Vet Inst Pulawy.* 2013, 57, 507-512.

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)

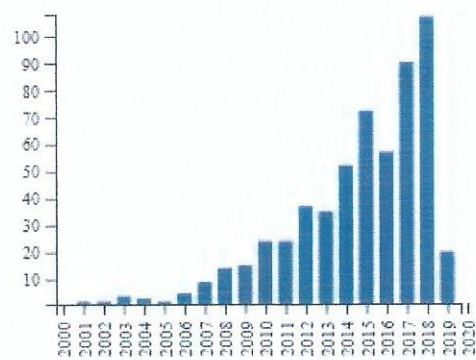
Liczba publikacji w czasopismach z listy JCR	69
- w tym: opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora	65
- w tym: stanowiących osiągnięcie habilitacyjne	9
Liczba publikacji w czasopismach spoza listy JCR oraz autorstwa w monografiach	46
Liczba komunikatów konferencyjnych	95
Sumaryczny współczynnik wpływu (Impact Factor, IF)	84,39
- w tym dla publikacji po uzyskaniu stopnia doktora	82,74
- w tym dla publikacji stanowiących osiągnięcie habilitacyjne	12,64
Suma punktów MNiSW	1464
- w tym: dla publikacji po uzyskaniu stopnia doktora	1440
- w tym: dla publikacji stanowiących osiągnięcie habilitacyjne	212
Liczba cytowań wg. Web of Science Core Collection	579
- w tym: bez autocytowań	485
Indeks Hirscha wg. Web of Science Core Collection	12

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	17 (4)
Medycyna Weterynaryjna -Veterinary Medicine-Science and Practice	1
Annals of Agricultural and Environmental Medicine	30 (12)
Veterinary Parasitology	2
Experimental Parasitology	1
Folia Parasitologica	5 (1)
Polish Journal of Veterinary Sciences	2
Acta Parasitologica	1
Parasitology Research	2
Parasites and Vectors	1
Food Control	1
Eurosurveillance	1
Experimental and Applied Acarology	1
Foodborne Pathogens and Disease	2 (1)
Polish Journal of Microbiology	1
Ticks and Tick-Borne Diseases	1
Liczba publikacji razem (w tym jako pierwszy autor)	69 (18)



Liczba publikacji w poszczególnych latach (wg. Web of Science - Core Collection, z dnia 10.04.2019)



Liczba cytacji w poszczególnych latach (wg. Web of Science - Core Collection, z dnia 10.04.2019)

Puławy, 2019.04.10

Jack Sroka