

**Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie**  
**Wydział Medycyny Weterynaryjnej**  
**Katedra Higieny Żywności Zwierzęcego Pochodzenia**

Załącznik nr 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie weterynaria

**AUTOREFERAT**

Wpływ zarażenia świń *Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi* i *Trichinella pseudospiralis* na zmiany w ich surowiczym proteomie, odpowiedź immunologiczną oraz rozmieszczenie larw w wybranych mięśniach ze szczególnym uwzględnieniem mięśni predylekcyjnych

Dr n. wet. Michał Gondek

Lublin, 2022

## 1. Dane osobowe

**Imiona i nazwisko:** Michał Rafał Gondek

**Miejsce pracy:** Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
Katedra Higieny Żywności Zwierzęcego Pochodzenia  
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin  
tel. +48 81 445 62 56, e-mail: [michal.gondek@up.lublin.pl](mailto:michal.gondek@up.lublin.pl)

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

**2019 r.** Komisja do Spraw Specjalizacji Lekarzy Weterynarii  
Weterynaryjne Centrum Kształcenia Podyplomowego  
Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy,  
Puławy  
**Tytuł:** Specjalista w dziedzinie Epizootiologia  
i Administracja Weterynaryjna

**2015 r.** Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
**Stopień naukowy:** doktor nauk weterynaryjnych  
Praca doktorska pt. „Wykrywanie doświadczalnej włośnicy  
świń wywołanej *Trichinella spiralis* testem  
immunoenzymatycznym (ELISA)” realizowana  
w Katedrze Higieny Żywności Zwierzęcego Pochodzenia  
pod kierunkiem dr. hab. Zygmunta Nowakowskiego

**2011 r.** Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
**Kierunek:** weterynaria  
**Tytuł:** lekarz weterynarii

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

<b>01.10.2017-obecnie</b>	adiunkt Katedra Higieny Żywności Zwierzęcego Pochodzenia Wydział Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
<b>01.10.2011-30.09.2017</b>	asystent Katedra Higieny Żywności Zwierzęcego Pochodzenia Wydział Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

**4. Wskazanie i omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).**

**4.1. Osiągnięcie stanowi cykl publikacji powiązanych tematycznie pod wspólnym tytułem:**

„Wpływ zarażenia świń *Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi* i *Trichinella pseudospiralis* na zmiany w ich surowiczym proteomie, odpowiedź immunologiczną oraz rozmieszczenie larw w wybranych mięśniach ze szczególnym uwzględnieniem mięśni predylekcyjnych”

**4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia stanowiącego podstawę ubiegania się o stopień doktora habilitowanego:**

4.2.1. **Gondek M.\***, Herosimczyk A., Knysz P., Ożgo M., Lepczyński A., Szkucik K. (2020). Comparative proteomic analysis of serum from pigs experimentally infected with *Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi*, and *Trichinella pseudospiralis*. *Pathogens*, 9(1), 55. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens9010055> (IF<sub>2020</sub> = 3,492; punktacja MNiSW = 100).

Mój wkład polegał na: opracowaniu koncepcji badań, pozyskaniu finansowania, przeprowadzeniu części doświadczalnej na zwierzętach (doświadczalne zarażenie świń, pobranie krwi i mięśni do badań), wytrawieniu tkanki mięśniowej w celu określenia intensywności inwazji larw *Trichinella* w mięśniach zarażonych świń, współudziale w analizach proteomicznych, wykonaniu analizy statystycznej, zebraniu piśmiennictwa, napisaniu manuskryptu oraz jego procedowaniu w czasopiśmie, przygotowaniu odpowiedzi na recenzje artykułu. Mój procentowy udział szacuję na 75%.

\* autor korespondencyjny

4.2.2. **Gondek M.**<sup>\*</sup>, Knysz P., Pomorska-Mól M., Ziomek M., Bień-Kalinowska J. (2020). Acute phase protein pattern and antibody response in pigs experimentally infected with a moderate dose of *Trichinella spiralis*, *T. britovi*, and *T. pseudospiralis*. *Veterinary Parasitology*, 288, 109277. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109277> (IF<sub>2020</sub> = 2,738; punktacja MNiSW = 140).

Mój wkład polegał na: opracowaniu koncepcji badań, pozyskaniu finansowania, przeprowadzeniu części doświadczalnej na zwierzętach (doświadczalne zarażenie świń, pobranie krwi i mięśni do badań), wytrawieniu tkanki mięśniowej w celu określenia intensywności inwazji larw *Trichinella* w mięśniach zarażonych świń, współdziałanie w badaniach serologicznych, wykonaniu analizy statystycznej, zebraniu piśmiennictwa, napisaniu manuskryptu oraz jego procedowaniu w czasopiśmie, przygotowaniu odpowiedzi na recenzje artykułu. Mój procentowy udział szacuję na 80%.

\* autor korespondencyjny

4.2.3. **Gondek M.**<sup>\*</sup>, Knysz P., Pyz-Łukasik R., Łukomska A., Kuriga A., Pomorska-Mól M. (2021). Distribution of *Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi*, and *Trichinella pseudospiralis* in the diaphragms and *T. spiralis* and *T. britovi* in the tongues of experimentally infected pigs. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 696284. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.696284> (IF<sub>2021</sub> = 3,471; punktacja MNiSW = 70).

Mój wkład polegał na: opracowaniu koncepcji badań, pozyskaniu finansowania, przeprowadzeniu części doświadczalnej na zwierzętach (doświadczalne zarażenie świń, pobranie mięśni do badań), wytrawieniu tkanki mięśniowej w celu określenia intensywności inwazji larw *Trichinella* w mięśniach zarażonych świń, wykonaniu analizy statystycznej, zebraniu piśmiennictwa, napisaniu manuskryptu oraz jego procedowaniu w czasopiśmie, przygotowaniu odpowiedzi na recenzje artykułu. Mój procentowy udział szacuję na 75%.

\* autor korespondencyjny

4.2.4. **Gondek M.**<sup>\*</sup>, Grzelak S., Pyz-Łukasik R., Knysz P., Ziomek M., Bień-Kalinowska J. (2022). Insight into *Trichinella britovi* infection in pigs: effect of various infectious doses on larvae density and spatial larvae distribution in carcasses and comparison of the detection of anti-*T. britovi* IgG of three different commercial ELISA tests and immunoblot assay. *Pathogens*, 11(7), 735. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens11070735> (IF<sub>2021</sub> = 4,531; punktacja MNiSW = 100).

Mój wkład polegał na: opracowaniu koncepcji badań, pozyskaniu finansowania, przeprowadzeniu części doświadczalnej na zwierzętach (doświadczalne zarażenie świń, pobranie krwi i mięśni do badań), wytrawieniu tkanki mięśniowej w celu określenia intensywności inwazji larw *Trichinella* w mięśniach zarażonych świń, współdziałanie w badaniach serologicznych, wykonaniu analizy statystycznej, zebraniu

piśmiennictwa, napisaniu manuskryptu oraz jego procedowaniu w czasopiśmie, przygotowaniu odpowiedzi na recenzje artykułu. Mój procentowy udział szacuję na 80%.

\* autor korespondencyjny

Wyniki badań przedstawione w publikacjach **4.2.1**, **4.2.2** i **4.2.4** były w całości (publikacja **4.2.1**) lub w części (publikacja **4.2.2** i **4.2.4**) finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu MINIATURA 1 (DEC-2017/01/X/NZ6/00582).

Łączna punktacja 4 prac wchodzących w skład jednotematycznego cyklu publikacji, zgodnie z rokiem ich opublikowania, wynosi:

- według listy czasopism punktowanych MNiSW: 410

- sumaryczny impact factor (IF) według listy JCR: 14,232

Fotokopie publikacji oraz oświadczenia współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie pracy znajdują się w załącznikach 5 i 6.

### **4.3. Omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

Nicienie z rodzaju *Trichinella* wywołują groźną dla zdrowia i życia ludzi pasożytniczą zoonozę – włośnicę. Cykl rozwojowy pasożyta zachodzi w jednym żywicielu, a podczas inwazji wyróżnić można dwie fazy: jelitową i mięśniową. Do zarażenia dochodzi wskutek spożycia surowego lub niedogotowanego mięsa lub produktów mięsnych zawierających inwazyjne larwy mięśniowe w stadium I (L1). Pod wpływem działania soku żołądkowego larwy włośni zostają uwolnione z włókien mięśniowych, po czym po osiągnięciu jelita cienkiego wnikają do kolumnowych komórek nabłonkowych narządu. Następnie larwy mięśniowe pasożyta przechodzą cztery wylinki, osiągając dojrzałość płciową w ciągu dwóch dni (Gottstein i wsp. 2009). Po kopulacji samice zaczynają uwalniać larwy nowo narodzone (*ang.* newborn larvae; NBL) w 5-7 dniu po zarażeniu (Gottstein i wsp. 2009). Ilość urodzonych przez samice larw uzależniona jest m.in. od gatunku włośnia, gatunku żywiciela oraz jego statusu immunologicznego. Larwy nowo narodzone wędrują z blaszki właściwej błony śluzowej jelita do włosowatych naczyń limfatycznych, a następnie do przewodu piersiowego i dalej naczyniami krwionośnymi do prawej komory serca i płuc. Poprzez lewą komorę serca larwy trafiają do krwioobiegu dużego, skąd migrują do różnych tkanek i narządów gospodarza, lecz docelową lokalizacją umożliwiającą dalszy ich rozwój są włókna tkanki mięśniowej poprzecznie prążkowanej (Kocięcka i wsp. 2003). Przyjmuje się, że w 17 dniu po zarażeniu larwy mięśniowe włośni stają się inwazyjne dla kolejnego żywiciela (Kocięcka i wsp. 2003). Czas ten istotnie zależy jednak od gatunku i szczepu *Trichinella* oraz gatunku żywiciela. Pasożyt po wniknięciu do włókna mięśniowego gospodarza powoduje w nim szereg zmian na poziomie molekularnym, strukturalnym i biochemicznym, prowadząc

do powstania tzw. „komórki piastunki” (*ang.* nurse cell-larva complex). W procesie tym, w odpowiedzi na inwazję, w zarażonych komórkach mięśniowych stwierdza się m.in. odróżnicowanie, ponowne wejście w cykl komórkowy oraz zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G<sub>2</sub>/M; w komórkach satelitarnych zaś proliferację i różnicowanie (Wu i wsp. 2008). Zmiany strukturalne komórek obejmują natomiast m.in. transformację bazofilną, tworzenie kolagenowej torebki wokół larwy włośnia oraz rozwój sieci naczyń krwionośnych otaczających torebkę i komórkę (Despommier 1993). W rezultacie „nurse-cell larva complex” chroni pasożyta przed mechanizmami odpornościowymi żywiciela oraz zaspokaja jego potrzeby żywieniowe i metaboliczne. W takich warunkach larwy mięśniowe *Trichinella* zdolne są przetrwać i zachować swoją inwazyjność nawet przez wiele lat po zarażeniu.

Obecnie w obrębie rodzaju *Trichinella* wyróżnia się dwa kłady, a klasyfikacja ta opiera się na zdolności pasożyta do indukcji tworzenia kolagenowej torebki wokół kompleksu „nurse-cell larva” w mięśniach zarażonego gospodarza. Kład włośni otorbionych obejmuje siedem gatunków (*T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. murrelli*, *T. nelsoni*, *T. patagoniensis*, *T. chanchalensis*) oraz trzy genotypy (*Trichinella* T6, *Trichinella* T8 i *Trichinella* T9), których pozycja taksonomiczna nie została jeszcze ustalona (Krivokapich i wsp. 2012; Pozio i Zarlenga 2005; Sharma i wsp. 2020). Gatunki i genotypy należące do kładu włośni otorbionych występują jedynie u ssaków, podczas gdy gatunki należące do kładu włośni nieotorbionych zdolne są do zarażania ssaków i ptaków (*T. pseudospiralis*) lub ssaków i gadów (*T. papue* i *T. zimbabwensis*). Spośród wszystkich opisanych gatunków i genotypów *Trichinella*, obecność trzech (*T. spiralis*, *T. britovi* i *T. pseudospiralis*) potwierdzono u naturalnie zarażonych świń w Europie, przy czym *Trichinella spiralis* jest gatunkiem dominującym w populacji świń europejskich. Według danych pozyskanych od 22 krajów członkowskich UE, a następnie opracowanych przez Referencyjne Laboratorium ds. *Trichinella*, 82% wszystkich izolatów włośni pochodzących od świń w Europie zostało zidentyfikowanych jako *T. spiralis*, natomiast 18% sklasyfikowano jako *T. britovi* (Pozio i wsp. 2009). Proporcje te są jednak inne w krajach, które wyeliminowały, podtrzymujący krążenie *T. spiralis*, synantropijny cykl transmisji pasożyta. Zarażenia wywołane przez *T. pseudospiralis* wykryto natomiast tylko u pojedynczych świń w Bośni i Hercegowinie, Słowacji oraz Chorwacji (Beck i wsp. 2009; Hurníková i wsp. 2005; Santrac i wsp. 2015). W Polsce *Trichinella spiralis* jest również najczęściej stwierdzanym gatunkiem włośnia u zarażonych świń, z kolei inwazje spowodowane przez *T. britovi* stanowią zaledwie 1% wszystkich przypadków włośnicy u tych zwierząt (Bilska-Zajac i wsp. 2020). Ten sam trend w dystrybucji gatunkowej *Trichinella* wykazano u dzików; jednak proporcja występowania *T. spiralis* / *T. britovi* jest zdecydowanie niższa i u dzików w Polsce wynosi odpowiednio 3:1 (Bilska-Zajac i wsp. 2013; Bilska-Zajac i wsp. 2020).

Mięso świń jest jednym z głównych źródeł zarażenia ludzi *Trichinella* spp. Dane epidemiologiczne z lat 1986–2009 wykazały, że 41% wszystkich przypadków i ognisk włośnicy u ludzi w Polsce było związanych właśnie ze spożyciem mięsa wieprzowego (Murrell i Pozio 2011). Według danych Głównego Inspektoratu Weterynarii włośnica u świń w Polsce wykrywana jest co roku, w latach 2010–2020 została stwierdzona u 242 osobników, a średnia prevalencja w wymienionym okresie czasu

wynosiła 0,0001%. Częstość występowania włośnicy u świń uzależniona jest od sposobu ich hodowli. Szczególnie narażone na zarażenie są bowiem świnię utrzymywane w warunkach chowów wolnowybiegowego oraz przydomowego, jak również w gospodarstwach o niskich standardach zoohigienicznych, w których zwierzęta mogą mieć nieograniczony kontakt z gryzoniami oraz dostęp do zwłok lub fragmentów zwłok zwierząt dzikich (Pozio 2014). Jak wykazały dochodzenia epidemiologiczne przeprowadzone w latach 2012-2020, w Polsce większość zarażonych włośniem świń pochodziła z małych gospodarstw, w których liczba utrzymywanych zwierząt nie przekraczała 100 (Bilska-Zajac i wsp. 2019). W tym samym jednak okresie czasu przypadki włośnicy stwierdzano również w większych hodowlach utrzymujących 360, a nawet 800 świń (Bilska-Zajac i wsp. 2021). Świadczyć to może o tym, że pomimo obserwowanego od lat 40 XX wieku systematycznego spadku przypadków włośnicy u świń w Polsce, problem zarażeń świń *Trichinella* jest nadal aktualny i powinien skłaniać środowiska naukowe do podejmowania badań w tym zakresie.

Zgodnie z zaleceniami opracowanymi przez Światową Organizację Zdrowia Zwierząt metody wykorzystywane do wykrywania włośnicy u świń można podzielić na bezpośrednie i pośrednie. Metody bezpośrednie takie jak trichinoskopia (metoda kompresorowa) i metoda wytrawiania pozwalają na bezpośrednie wykrywanie pod mikroskopem larw włośni w tkance mięśniowej lub uwidocznienie pasożyta po jego uwolnieniu z mięśni techniką sztucznego trawienia. Metody pośrednie obejmują natomiast testy serologiczne (ELISA, Western blot) wykrywające krążące, specyficzne przeciwciała anty-*Trichinella* IgG.

W Polsce, podobnie jak w wielu innych krajach Unii Europejskiej, mięso świń, które jest przeznaczone do spożycia przez ludzi podlega obowiązkowemu badaniu na włośnię. Zgodnie z Rozporządzeniem Wykonawczym Komisji (UE) 2015/1375 referencyjną metodą stosowaną do badania mięsa świń oraz innych gatunków zwierząt rzeźnych na obecność włośni jest metoda wytrawiania próby zbiorczej z zastosowaniem magnetycznego mieszania. Procedura ta i sposób pobierania próbek zostały opisane w normie ISO 18743:2015 oraz Instrukcji Głównego Lekarza Weterynarii z dnia 22 czerwca 2021 r. Metoda kompresorowa natomiast może być stosowana tylko i wyłącznie do badania świń, których mięso przeznaczone jest na użytek własny, a sposób jej wykonania oraz rodzaj mięśni pobieranych do badań zostały podane w załączniku nr 2 i 3 do Rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 21 października 2010 roku w sprawie wymagań weterynaryjnych przy produkcji mięsa przeznaczonego na użytek własny. Należy podkreślić jednak, że zgodnie z wytycznymi Międzynarodowej Komisji Włośnicowej, Unii Europejskiej oraz Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt metoda kompresorowa nie jest obecnie rekomendowaną techniką do wykrywania włośnicy u świń oraz innych gatunków zwierząt rzeźnych, których mięso przeznaczone jest do spożycia przez ludzi. Testy serologiczne z kolei mogą być stosowane jedynie do badań monitoringowych stad świń w kierunku włośnicy. Obecnie test immunoenzymatyczny (ELISA) oparty na antygenie wydzielniczo-wydalniczym (*ang.* excretory-secretory antigens; ES) larw mięśniowych włośni jest najpowszechniejszą oraz jedyną rekomendowaną przez Międzynarodową Komisję Włośnicową metodą używaną do

wykrywania specyficznych przeciwciał anti-*Trichinella* IgG u świń. Ponadto w celu weryfikacji pozytywnych wyników uzyskanych w teście ELISA, zaleca się stosowanie testu Western blot opartego również na pozyskanym z larw mięśniowych włośni antygenie ES (Gómez-Morales i wsp. 2012; OIE 2018). Przyjmuje się, że czas potrzebny do powstania specyficznych przeciwciał anti-*Trichinella* IgG od momentu zarażenia zwierzęcia zależy od dawki włośni wywołującej zarażenie, intensywności inwazji włośni w mięśniach (tj. liczby larw w 1 gramie tkanki mięśniowej), gatunku *Trichinella* oraz gatunku, a nawet rasy żywiciela. Wpływ na wykrywalność tych przeciwciał może mieć również gatunek włośnia, z którego pozyskano antygen ES wykorzystany następnie w procedurze ELISA. Należy jednak dodać, że większość badań dotyczących humoralnej odpowiedzi immunologicznej oraz przydatności testów serologicznych do wykrywania włośnicy u świń wykonano stosując model eksperymentalny, w którym zwierzęta zarażane były jedynie *T. spiralis*.

Poznanie mechanizmów immunologicznych towarzyszących zarażeniom pasożytami pozwala na lepsze zrozumienie interakcji żywiciel-pasożyt oraz opracowanie testów i procedur diagnostycznych ułatwiających lub umożliwiających wykrycie inwazji. Wykazano, głównie na modelu mysim, że w fazie jelitowej zarażenia *T. spiralis* odpowiedź immunologiczna typu Th1 dominuje i przyczynia się do eliminacji pasożytów (Yu i wsp. 2013). Podczas fazy mięśniowej natomiast następuje indukcja odpowiedzi typu Th2, która łagodzi uszkodzenia tkanek i może wzmacnić ich naprawę (Yu i wsp. 2013). U myszy doświadczalnie zarażonych *T. spiralis* następuje również indukcja silnej odpowiedzi ze strony limfocytów Treg charakteryzująca się ilościowym wzrostem komórek CD4+CD25+Foxp3+ i której towarzyszy wysoki poziom IL-10 i TGF- $\beta$  (Sun i wsp. 2019). U świń zarażonych doświadczalnie *T. spiralis* z kolei stwierdza się wzrost limfocytów B, TCD3+, CD4+, Treg oraz Th17, a spadek limfocytów TCD8+. Nieliczne tylko badania, w tym te przeprowadzone przez Wang'a i wsp. (2020) wskazują, że u świń zarażonych doświadczalnie *T. spiralis* następuje głównie indukcja odpowiedzi immunologicznej typu Th2 i Treg, która tłumia odpowiedź Th1. Picherot i wsp. (2007) wykazali również, że u świń zarażonych *T. spiralis* następuje wzrost ekspresji IL-10 i IFN- $\gamma$  w błonie śluzowej jelit oraz IL-6 i IL-12 w śledzionie co świadczyć może o mieszanej odpowiedzi Th1/Th2, z przewagą jednak odpowiedzi typu drugiego. Wiele jednak zjawisk immunologicznych, jak na przykład reakcja ostrej fazy, towarzyszących inwazji *Trichinella* u świń, szczególnie zarażonych innymi niż *T. spiralis* gatunkami włośni oraz różnymi dawkami pasożyta, pozostaje niepoznana i wymaga dalszych badań.

Od niedawna nowoczesne techniki proteomiczne zaczęły być stosowane na szeroką skalę w badaniach nad różnymi patogenami u zwierząt. W badaniach tych wykorzystywane są różne metody oparte m.in. na elektroforetycznym rozdziale białek, wysokosprawnej chromatografii cieczowej oraz spektrometrii mas. Na podstawie dostępnej, aktualnej literatury wskazać można dwie główne strategie proteomicznych badań nad włośniem i włośnicą, tj.: (1) identyfikację immunoreaktywnych białek z różnych stadiów rozwojowych oraz struktur anatomicznych poszczególnych gatunków a nawet szczepów *Trichinella* reagujących z przeciwciałami zarażonego gospodarza oraz (2) identyfikację białek zarażonego organizmu, których ekspresja w płynach tkankowych takich jak surowica ulega



zmianie podczas trwania inwazji. Celem wspólnym jest opracowanie testów serologicznych opartych na białkach rekombinowanych, które byłyby w stanie wykryć włośnicę we wczesnej, jelitowej fazie zarażenia; zidentyfikowanie surowiczych, białkowych markerów dla tej zoonozy; opracowanie skutecznej szczepionki zwłaszcza z przeznaczeniem dla świń oraz poznanie i lepsze zrozumienie mechanizmów towarzyszących inwazji w różnych jej fazach. Zidentyfikowano wiele białek wchodzących w skład antygeny ekskrecyjno-sekrecyjnego, somatycznego czy też powierzchniowego larw mięśniowych oraz postaci dorosłych *Trichinella* mających zdolność indukcji odpowiedzi immunologicznej u zarażonych osobników. Szczególnie istotne znaczenie z punktu widzenia wczesnej diagnostyki włośnicy mogą odgrywać białka szoku cieplnego w tym białko Hsp70, białko 14-3-3, proteaza cysteinowa, proteaza serynowa, DNaza II, białko o domenach podobnych do cystatyny, enolaza czy też 5'-nukleotydaza (Bień i wsp. 2015; Cui i wsp. 2013; Liu i wsp. 2016; Wang i wsp. 2014; Yang i wsp. 2015). Przydatność diagnostyczna tych białek musi jednak zostać potwierdzona w przeprowadzonych na znacznie szerszą skalę badaniach walidacyjnych z wykorzystaniem świń zarażonych doświadczalnie różnymi gatunkami i dawkami *Trichinella* oraz świń zarażonych naturalnie.

W Polsce i na świecie dotychczas nie przeprowadzono badań nad zmianami w surowiczym proteomie świń zarażonych różnymi gatunkami *Trichinella*. Ponadto brak jest danych odnośnie zmian w poziomie białek ostrej fazy takich jak białko C-reaktywne (CRP), haptoglobina (Hp), surowiczy amyloid A (SAA) oraz główne białko ostrej fazy świń (Pig-MAP) w surowicy świń zarażonych *T. spiralis*, *T. britovi* i *T. pseudospiralis* oraz ich ewentualnej przydatności w diagnostyce włośnicy u tych zwierząt. W Polsce nie przeprowadzono również badań nad inwazyjnością krążących w populacji świń europejskich trzech gatunków włośni w stosunku do rodzimych ras świń oraz możliwością zastosowania testów ELISA i Western blot opartych na antygenach wydzielniczo-wydalniczych różnych gatunków *Trichinella* do wykrywania inwazji świń wywołanej *T. spiralis*, *T. britovi* oraz *T. pseudospiralis*. Pomimo istnienia przepisów, w których zawarte są informacje dotyczące rodzaju mięśni pobieranych do badań świń w kierunku *Trichinella* spp., w dostępnej literaturze światowej brak jest również danych dotyczących dystrybucji larw mięśniowych włośni należących do gatunków innych niż *T. spiralis* w poszczególnych mięśniach świń ze szczególnym uwzględnieniem mięśni predylekcyjnych takich jak przepona oraz język.

Stąd celem badań osiągnięcia będącego podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego była ocena zmian w surowiczym proteomie świń doświadczalnie zarażonych umiarkowanymi dawkami *T. spiralis*, *T. britovi* i *T. pseudospiralis*, poznanie przebiegu odpowiedzi głównych białek ostrej fazy podczas inwazji spowodowanej *Trichinella* spp., przesłedzenie humoralnej odpowiedzi immunologicznej i ocena przydatności testów ELISA i Western blot do wykrywania włośnicy świń oraz analiza rozmieszczenia larw mięśniowych *Trichinella* spp. w wybranych mięśniach zarażonych zwierząt.

Powyższe cele zrealizowano poprzez następujące działania:

1. Zbadanie wpływu zarażenia świń rodzimych ras (Wielka Biała Polska x Puławska) hodowanych w Polsce trzema różnymi gatunkami *Trichinella* należącymi do kladu włośni otorbionych (tj. *T. spiralis*, *T. britovi*) i nieotorbionych (*T. pseudospiralis*) na zmiany w ich surowiczym proteomie podczas fazy jelitowej oraz mięśniowej inwazji.
2. Zbadanie odpowiedzi ostrej fazy, mierzonej surowiczym poziomem CRP, Hp, SAA oraz Pig-MAP, u świń zarażonych umiarkowanymi dawkami (1000-3000 ML) *T. spiralis*, *T. britovi* i *T. pseudospiralis*.
3. Zbadanie humoralnej odpowiedzi immunologicznej świń zarażonych umiarkowanymi dawkami *T. spiralis*, *T. britovi* i *T. pseudospiralis* poprzez ocenę kinetyki produkcji przeciwciał klasy G i M przeciwko antygenom wydzielniczo-wydalniczym larw mięśniowych włośni w krótkich interwałach czasowych po zarażeniu.
4. Zbadanie przydatności: (i) testów ES ELISA typu „in-house” opartych na homologicznym oraz heterologicznym antygenie ekskrecyjno – sekrecyjnym pozyskanym z larw mięśniowych *Trichinella* oraz (ii) komercyjnego zestawu ES-ELISA do wykrywania włośnicy świń zarażonych umiarkowanymi dawkami *T. spiralis*, *T. britovi* oraz *T. pseudospiralis*.
5. Porównanie i ocenę przydatności trzech różnych komercyjnych, dostępnych na rynku europejskim zestawów ELISA opartych na antygenie ES *Trichinella* spp. oraz testu ES-Western blot opartego na homologicznym antygenie ES larw mięśniowych *T. britovi* do wykrywania anti-*T. britovi* IgG w surowicy świń zarażonych doświadczalnie dawką 5000 inwazyjnych larw mięśniowych *Trichinella britovi*.
6. Zbadanie rozmieszczenia larw: (i) *T. spiralis*, *T. britovi*, *T. pseudospiralis* w trzech różnych częściach anatomicznych przepony (części łędźwiowej, części żebrowej i części mostkowej); (ii) *T. spiralis* i *T. bitovi* w trzech różnych częściach anatomicznych języka (wierzchołek, trzon i korzeń) oraz (iii) *T. britovi* w 15 różnych mięśniach (przepona, język, m. żwacz, m. skrzydłowy boczny i przyśrodkowy, mm. międzyżebrowe, mm. brzucha, m. najdłuższy klatki piersiowej, mm. szyi, m. łędźwiowy większy i mniejszy, m. trójgłowy ramienia, m. dwugłowy uda, mm. prostowniki przedramienia, mm. zginacze przedramienia, mm. prostowniki podudzia, mm. zginacze podudzia) tusz zarażonych świń.

Zgodę na przeprowadzenie badań doświadczalnych na świnia wydała II Lokalna Komisja Etyczna do spraw doświadczeń na zwierzętach przy Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie – Uchwała nr 34/2013, 4/2014, 77/2015, 73/2017.

#### **4.3.1. Opis szczegółowy prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wraz z omówieniem wyników:**

Praca 4.2.1. Gondek M., Herosimczyk A., Knysz P., Ożgo M., Lepczyński A., Szkucik K. (2020). Comparative proteomic analysis of serum from pigs experimentally infected with *Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi*, and *Trichinella pseudospiralis*. Pathogens, 9(1), 55.

Na podstawie danych literaturowych wnioskować można, że surowica świń zarówno zdrowych jak i cierpiących na rozmaite choroby wirusowe lub bakteryjne jest jedną z najintensywniej badanych matryc przy użyciu różnych technik proteomicznych (Genini i wsp. 2012; Gong i wsp. 2017; Liu i wsp. 2011; Marco-Ramell i wsp. 2011; Miller i wsp. 2009; Ożgo i wsp. 2015; Srikanth i wsp. 2017; Sun i wsp. 2011; Yin i wsp. 2017). Surowica, jako próbka do badań, jest łatwa do pozyskania od zwierząt, a jej profil białkowy odzwierciedla status zdrowotny badanego osobnika. W przypadku jednak badań nad włośniami i włośnicą, znakomita większość prac eksperymentalnych prezentuje wyniki z zakresu immunoproteomiki, w których immunoreaktywne białka pochodzące z różnych stadiów rozwojowych i organów lub części pasożyta poddane zostały szczegółowej analizie proteomicznej (Bień i wsp. 2012; Bień i wsp. 2015; Cui i wsp. 2013; Cui i wsp. 2014; Liu i wsp. 2016; Wang i wsp. 2013; Wang i wsp. 2014; Yang i wsp. 2015). Ponadto spośród różnych gatunków włośni, *Trichinella spiralis* badany jest najczęściej i traktowany jako organizm modelowy dla całego rodzaju. W związku z tym większość dostępnych badań pozwoliło scharakteryzować tylko reagujące z przeciwciałami (najczęściej klasy G) gospodarza, białka specyficzne dla poszczególnych postaci rozwojowych *Trichinella spiralis* (np. 5'-nukleotydaza, proteaza serynowa, glikoproteina p43, deoksyrybonukleaza II i wiele innych) i nie dostarczyły tym samym żadnych informacji na temat zmian w surowiczym proteomie zarażonych osobników. Jednocześnie, z punktu widzenia optymalizacji kosztów hodowli, istnieje potrzeba opracowania nowych testów diagnostycznych pozwalających na jak najszybsze, przyżyciowe wykrywanie włośnicy u świń, co pozwoliłoby na eliminację chorych osobników z dalszego cyklu produkcyjnego. W badaniach własnych dokonano zatem oceny zmian w surowiczym proteomie świń w odpowiedzi na doświadczalne ich zarażenie umiarkowanymi dawkami *T. spiralis* (1000 *T. spiralis*/świnie; n=6), *T. britovi* (3000 *T. britovi* na świnie; n=6) oraz *T. pseudospiralis* (2000 *T. pseudospiralis*/świnie; n=6). W doświadczeniu wykorzystano świnię skrzyżowanych ras Wielkiej Białej Polskiej i Puławskiej. Do zarażenia świń użyto szczepy *T. spiralis* i *T. britovi*, które wyizolowane zostały w Polsce z mięśni naturalnie zarażonych dzików i których przynależność gatunkową potwierdzono testem mPCR oraz referencyjny szczep *T. pseudospiralis* ISS013. Dawka pasożyta użyta do zarażenia została ustalona w oparciu o różnice we wskaźniku reprodukcyjności (*ang.* reproductive capacity index; RCI) poszczególnych gatunków *Trichinella* oraz wyniki wcześniejszych badań. Próbkę surowic analizowano w 13 dniu (faza jelitowa inwazji) oraz 60 dniu (faza mięśniowa inwazji) po zarażeniu świń stosując metody oparte na rozdziale białek przy użyciu elektroforezy dwukierunkowej

oraz ich identyfikacji z wykorzystaniem spektrometrii mas typu MALDI-TOF (*ang.* matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight).

### **I. Charakterystyka białek, których ekspresja uległa zmianie w surowicy świń zarażonych *T. spiralis*, *T. britovi* i *T. pseudospiralis* w 13 dniu po zarażeniu:**

Porównawcza analiza densytometryczna uzyskanych obrazów rozdziału białek wykazała, że pięć spotów białkowych wykazywało statystycznie istotne różnice relatywnej koncentracji w grupie świń zarażonych *T. spiralis* w porównaniu do grupy kontrolnej w 13 dniu po zarażeniu; ekspresja (abundance) dwóch zwiększyła się, natomiast pozostałych trzech uległa zmniejszeniu (test *t*-Studenta,  $P < 0.05$ ). Masa cząsteczkowa białek, których ekspresja istotnie się zmieniła wahała się od 35 kDa do 83.90 kDa. Spośród tych 5 białkowych spotów, wykorzystując spektrometr mas MALDI TOF/TOF i metody identyfikacji białek na podstawie masy fragmentów peptydów, zidentyfikowano cztery, tj. fragment stały łańcucha ciężkiego IgM, prekursor antytrombiny III, klusterynę oraz łańcuch gamma immunoglobulin. Z kolei w surowicy świń zarażonych *T. britovi* w 13 dniu po zarażeniu stwierdzono statystycznie istotne różnice relatywnej koncentracji trzech białkowych spotów (statystycznie istotny wzrost ekspresji wszystkich trzech) w porównaniu do grupy kontrolnej (test *t*-Studenta,  $P < 0.05$ ), a ich masa cząsteczkowa wynosiła 23.90 i 84 kDa. Spośród nich zidentyfikowano dwa białka: fragment stały łańcucha ciężkiego IgM oraz homeotyczne białko Mohawk. W ostatniej grupie świń zarażonych *T. pseudospiralis* wykazano, że sześć białkowych spotów uzyskanych w elektroforezie 2-DE o masie cząsteczkowej w zakresie 25.50-40.10 kDa różniło się statystycznie w porównaniu do grupy kontrolnej (statystycznie istotny wzrost ekspresji 1 spotu białkowego i spadek pozostałych 5) w 13 dniu po zarażeniu (test *t*-Studenta,  $P < 0.05$ ). Spośród nich zidentyfikowano klusterynę, apolipoproteinę E oraz prekursor surowiczego amyloidu P (ilościowy spadek wszystkich z nich). W badaniach własnych wykazano, że białka, których ekspresja w 13 dniu po zarażeniu świń *Trichinella* spp. była istotnie różna w porównaniu do kontrolnej, niezarażonej grupy zwierząt pełnią różne funkcje biologiczne.

Klusteryna (apolipoproteina J; Apo J) krąży we krwi w postaci wolnej lub związanej z lipoproteinami, głównie frakcją HDL, rzadziej natomiast z LDL/VLDL (Karlsson i wsp. 2005; Sin i wsp. 2010; Stuart i wsp. 1992). Chociaż dokładne funkcje klusteryny nie są w pełni poznane, najnowsze badania wskazują, że białko to jest zaangażowane w wiele procesów biologicznych, w tym w apoptozę (Trougakos i wsp. 2009; Zhang i wsp. 2005), metabolizm lipidów (Baralla i wsp. 2015; Heo i wsp. 2018), odnowę błon komórkowych, regulację układu dopełniacza (Tschopp i French 1994) lub pełni funkcję białka opiekuńczego (Poon i wsp. 2002). Podwyższone surowicze stężenie klusteryny obserwowano w przebiegu różnych chorób u ludzi, takich jak cukrzyca (Trougakos i wsp. 2002), choroba wieńcowa (Trougakos i wsp. 2002), łuszczyca (Buquicchio i wsp. 2017), przewlekła pokrzywka spontaniczna (Kim i wsp. 2016), wstrząs septyczny (Kalenka i wsp. 2006) oraz w kilku chorobach nowotworowych, jak np. rak jelita grubego (Rodríguez-Piñeiro i wsp. 2006) czy rak prostaty (Miyake i wsp. 2010). Z drugiej strony, obniżone stężenie klusteryny w surowicy zostało udowodnione

podczas choroby zwyrodnieniowej stawów (Kropáčková i wsp. 2018), tocznia rumieniowatego układowego (Newkirk i wsp. 1999), posocznicy (Høgåsen i wsp. 1994), raka wątrobowokomórkowego (Wang i wsp. 2010) i raka płaskonabłonkowego przełyku (Zhang i wsp. 2004). Zgodnie z danymi dostarczonymi przez Mido i wsp. (2012) zarażenie *Trichinella spiralis* może indukować zaburzenia metabolizmu lipidów, ze zmniejszoną aktywnością paraoksonazy-1 i obniżonym surowiczym stężeniem HDL, a wyniki tych badań mogą częściowo wyjaśniać zaobserwowane w badaniach własnych zmiany ekspresji Apo J w surowicy świń w 13 dniu po ich zarażeniu. Ponadto izoforma 2 klusteryny bierze udział w regulacji programowanej śmierci komórki, a niski jej poziom może aktywować gen *p53*, zmniejszać ekspresję białek z rodziny Bcl-2 i Bcl-xl i w konsekwencji powodować większą podatność komórek na apoptotyczne działanie białka Bax (szlak mitochondrialny) (Koltai 2014). Dostępne badania wskazują również, że podczas inwazji *T. spiralis* ekspresja mitochondrialnych genów apoptozy, takich jak *BAX*, *apaf-1*, *kaspaza 9* i *p53*, wzrasta począwszy właśnie od 13 dnia po zarażeniu osiągając szczyt w 18 dniu po zarażeniu (Boonmars i wsp. 2004; Boonmars i wsp. 2005).

W badaniach własnych stwierdzono również obniżony poziom ekspresji prekursora antytrombiny III (AT III) w surowicy tylko jednej grupy doświadczalnej, tj. u świń zarażonych *T. spiralis*. Antytrombina III uczestniczy w regulacji procesu krzepnięcia krwi, będąc głównym inhibitorem trombiny, czynnika Xa oraz w mniejszym stopniu czynników IXa, XIa i XIIa (Maclean i wsp. 2007). Stąd niedobór AT III stwarza ryzyko wystąpienia chorób zakrzepowo-zatorowych. Ponadto zgodnie z danymi dostarczonymi przez Niessena i wsp. (1997) antytrombina III pełni funkcję negatywnego białka ostrej fazy. Stwierdzony w badaniach własnych spadek ekspresji prekursora AT III (13 dzień po zarażeniu) odpowiada ostrej fazie inwazji, podczas której larwy *Trichinella spiralis* migrują przez różne tkanki i narządy wywołując zaburzenia immunologiczne, patologiczne i metaboliczne, którym często towarzyszą ciężkie objawy kliniczne stwierdzane zwłaszcza u ludzi. Z oczywistych względów dostępna literatura nie dostarcza informacji na temat zaburzeń hemodynamicznych w przebiegu włośnicy u świń. Udowodniono jednak, że zarażenie *Trichinella* może wywoływać zaburzenia krzepnięcia krwi u ludzi - podczas inwazji obserwowano następujące powikłania zakrzepowe: zakrzepicę zatoki strzałkowej górnej (Evans i Pattern 1982); zakrzepicę komór serca, która wystąpiła 3 tygodnie po zarażeniu *Trichinella spiralis* (Tint i wsp. 2009); oraz rozpoznaną w ciągu dwóch tygodni po zarażeniu *Trichinella nativa* zakrzepicę zatok jamistych powikłaną przejściowym porażeniem nerwu czaszkowego VI (Dalcin i wsp. 2017). Ponadto w przebiegu trichinellozy u ludzi opisano również występowanie zespołu rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego w różnych narządach (Ursell i wsp. 1984). W związku z powyższym, należy przypuszczać, że obniżony poziom AT III może powodować zaburzenia hemostatyczne i prowadzić do zakrzepicy we wczesnej, ostrej fazie włośnicy wywołanej przez *T. spiralis*.

Prekursor apolipoproteiny E (Apo E) jest kolejnym białkiem, związanym z metabolizmem lipidów, którego ekspresja uległa zmianie w odpowiedzi na zarażenie świń włośniem. Znaczące obniżenie poziomu prekursora Apo E stwierdzono w surowicy świń zarażonych *Trichinella*

*pseudospiralis* w 13 dniu po zarażeniu, jak również w próbkach surowicy pobranych od świń zarażonych *Trichinella britovi* w 60 dniu inwazji. W celu wyjaśnienia przyczyny obniżonego poziomu Apo E stwierdzonego w badaniach własnych należy rozważyć kilka różnych patomechanizmów towarzyszących inwazji *Trichinella*. Jak już wspomniano, *Trichinella* wywołuje zmiany w metabolizmie lipidów u eksperymentalnie zarażonych szczurów. Ponadto wykorzystując szczury jako model badawczy, Farid i wsp. (2017) wykazali, że zarażenie *Trichinella spiralis* może indukować zapalenie wątroby zarówno w fazie jelitowej jak i mięśniowej inwazji. Spadek poziomu apolipoprotein (Apo E, Apo A-I) wykazano również podczas dysfunkcji wątroby w odpowiedzi na różne czynniki uszkodzające (Perales i wsp. 1994; Spósito i wsp. 1997). Przypuszczać zatem należy, że zaobserwowane w badaniach własnych obniżenie poziomu Apo E może być związane z czasowym zaburzeniem funkcji wątroby spowodowanej bezpośrednimi (migrujące larwy) lub pośrednimi (odpowiedź immunologiczna, eozynofilia) czynnikami uszkodzającymi ten narząd podczas zarażenia włośniem. Ponadto poziom ekspresji Apo E istotnie zależy od profilu wydzielanych cytokin. Istnieje dobrze poznany mechanizm, który dowodzi, że niektóre cytokiny prozapalne takie jak TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  czy IL-1 $\beta$ , zmniejszają produkcję Apo E przez makrofagi (Braesch-Andersen i wsp. 2013; Brand i wsp. 1993). Badania przeprowadzone głównie na myszach lub szczurach wykazały wzrost ekspresji tych mediatorów we wczesnej i późnej fazie inwazji *Trichinella* (Farid i wsp. 2017; Stadnyk i Kearskey 1996). Zmiany profilu produkcji cytokin mogą więc również częściowo wpływać na stwierdzone w badaniach własnych zmiany ekspresji prekursora Apo E w surowicy zarażonych świń. Wreszcie wykazano, że stres oksydacyjny istotnie moduluje ekspresję Apo E w tkance tłuszczowej i adipocytach (Espiritu i Mazzone 2008). Inwazjom pasożytniczym, w tym włośnicy, towarzyszy stres oksydacyjny (Derda i wsp. 2004; Selkirk i wsp. 1998; Smith i Bryant 1989); wykazano, że począwszy od drugiego/czwartego tygodnia po zarażeniu poziom dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), peroksydazy glutationowej (GPx), S-transferazy glutationowej (GST) i dialdehydu malonowego (MDA) ulega podwyższeniu (Derda i wsp. 2003; Derda i wsp. 2004; Gabrashanska i wsp. 2010). Zaburzenia równowagi oksydacyjnej mogą również tłumaczyć spadek ekspresji Apo E w surowicy doświadczalnie zarażonych świń.

Prekursor surowiczego amyloidu P (SAP) jest kolejnym białkiem, które zostało pomyślnie zidentyfikowane za pomocą spektrometrii masowej i którego statystycznie istotny spadek stwierdzono w surowicy w 13 dniu po zarażeniu świń *T. pseudospiralis*. SAP wiąże się m.in. z włóknkami amyloidowymi i czynnikami zakaźnymi, takimi jak wirusy chorobotwórcze (Herbert i wsp. 2002), różne gatunki bakterii (Noursadeghi i wsp. 2000) lub grzybów (Behrens i wsp. 2019). Nadal nie jest w pełni wiadomo, czy SAP pomaga gospodarzowi podczas infekcji, czy raczej chroni patogen, ale wykazano, że u myszy działa on jako pozytywne białko ostrej fazy, którego koncentracja wzrasta prawie 50-krotnie podczas reakcji zapalnej. W przeciwieństwie do powyższych danych, w badaniach własnych zaobserwowano ponad 5-krotny spadek poziomu ekspresji prekursora surowiczego amyloidu P u świń zarażonych *T. pseudospiralis*, a przyczyna tego zjawiska jest trudna do wytłumaczenia. Niskie jednak stężenie SAP w surowicy jest charakterystyczną cechą wielu chorób wątroby występujących u ludzi

(Levo i wsp. 1982; Pepys i wsp. 1978). Zaobserwowany w badaniach własnych istotny spadek ekspresji prekursora surowiczego amyloidu P może być zatem związany z zaburzeniami czynności tego narządu spowodowanymi inwazją *Trichinella*. Konieczne jest jednak podjęcie dalszych badań, aby w pełni zrozumieć rolę białka SAP u zdrowych świń, a także tych zarażonych *Trichinella* spp.

W badaniach własnych zidentyfikowano również białko homeobox Mohawk (Mkx, Irxl), którego statystycznie istotny wzrost ekspresji stwierdzono w grupie świń zarażonych *T. britovi*. Gen *homeobox Mohawk (Mkx)* koduje 353 aminokwasowe białko, które wykazuje aktywność represora transkrypcji (Anderson i wsp. 2006; Anderson i wsp. 2009). *Mkx* ulega ekspresji, głównie podczas embriogenezy w komórkach progenitorowych mięśni szkieletowych, ścięgien i chrząstki, rozwijających się gonad i nerek (Anderson i wsp. 2006; Liu i wsp. 2006; Takeuchi i Bruneau 2007). Kilka zaledwie badań wykazało, że białko Mohawk ma kluczowe znaczenie dla rozwoju układu mięśniowo-szkieletowego. Działa jako represor negatywnych czynników regulatorowych syntezy kolagenu typu I (Ito i wsp. 2010), odgrywa negatywną rolę regulacyjną w różnicowaniu mięśni (Anderson i wsp. 2009; Chuang i wsp. 2014) oraz bierze udział w rozwoju ścięgien (Ito i wsp. 2010). Biorąc pod uwagę, że niektóre funkcje molekularne takie jak tłumienie różnicowania mioblastów poprzez zmiany ekspresji *myoD* lub regulacja syntezy kolagenu typu I, są zbieżne zarówno dla produktów wydzielniczo-wydalniczych larw mięśniowych *Trichinella* jak i białka Mohawk, sądzić należy, że *Mkx* może również odgrywać rolę w przemodelowaniu tkanki mięśniowej będąc endogenną odpowiedzią gospodarza na inwazję pasożyta. Poznanie jednak w pełni mechanizmu molekularnego odpowiedzialnego za regulację ekspresji białka *Mkx* podczas włośnicy u świń wymaga dalszych badań.

## **II. Charakterystyka białek, których ekspresja uległa zmianie w surowicy świń zarażonych *T. spiralis*, *T. britovi* i *T. pseudospiralis* w 60 dniu po zarażeniu:**

Odrębny profil proteomiczny surowic świń doświadczalnie zarażonych trzema gatunkami włośni wykazano w 60 dniu po zarażeniu zwierząt, co odpowiada późnej, mięśniowej fazie inwazji.

W grupie świń zarażonych *T. spiralis* wykazano 5 białkowych spotów, których relatywna koncentracja różniła się statystycznie istotnie (test *t*-Studenta,  $P < 0.05$ ) w porównaniu do grupy kontrolnej; wszystkie charakteryzował wzrost ekspresji, lecz spośród nich zidentyfikowano jedynie łańcuchy lambda regionu C immunoglobulin. W grupie świń zarażonych *T. britovi* wykazano w analizie 2-DE statystyczne różnice relatywnej koncentracji sześciu białkowych spotów w porównaniu do grupy kontrolnej (test *t*-Studenta,  $P < 0.05$ ), a ich masa cząsteczkowa wahała się od 12.90 do 32.90 kDa. W przypadku pięciu stwierdzono wzrost relatywnej ekspresji (w tej grupie zidentyfikowano jedno tylko białko: łańcuch lambda regionu C immunoglobulin), zaś w przypadku pozostałego białkowego spotu wykazano spadek ekspresji (zidentyfikowany jako apolipoproteina E). Z kolei w grupie świń zarażonych *T. pseudospiralis* wykazano w obrazie elektroforetycznym tylko dwa białkowe spoty, które statystycznie istotnie różniły się w porównaniu do grupy kontrolnej (test *t*-Studenta,  $P < 0.05$ ); jeden z nich charakteryzował się wzrostem relatywnej ekspresji (fragment C3 dopełniacza), a pozostały

spadkiem (apolipoproteina A-I).

Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że w 60. dniu po zarażeniu świń, białkami, których ekspresja w surowicy zarażonych eksperymentalnie zwierząt uległa obniżeniu były te, których funkcje związane są z metabolizmem lipidów. Stwierdzono spadek relatywnej ekspresji prekursora apolipoproteiny E w odpowiedzi na doświadczalne zarażenie świń *T. britovi* oraz apolipoproteiny A-I (Apo A-I) w surowicy świń zarażonych *T. pseudospiralis*. Obniżoną ekspresję Apo A-I można częściowo przypisać opisanym wcześniej mechanizmom, odpowiadającym za spadek ekspresji zarówno Apo E jak i Apo J, a mianowicie podwyższonemu poziomowi cytokin prozapalnych, które wyłączają indukcję Apo A-I, czy też zaburzeniom równowagi oksydacyjnej. Ponadto u świń Apo A-I należy do negatywnych białek ostrej fazy (Carpintero i wsp. 2005), zatem obniżenie jej koncentracji może świadczyć o progresji procesu zapalnego w fazie mięśniowej inwazji wywoływanej przez nieotorbione genotypy *Trichinella*. Liczne również badania wykazały, że HDL i Apo A-I, która jest głównym składnikiem HDL, wykazują działanie przeciwzakrzepowe (Epanand i wsp. 1994; Fernandez i wsp. 2015). W związku z tym należy przypuszczać, że obniżenie ekspresji Apo A-I może również przyczyniać się do powstania zaburzeń krzepnięcia krwi i choroby zakrzepowej podczas inwazji *T. pseudospiralis*.

W późnej fazie inwazji w surowicach świń zarażonych otorbionymi gatunkami *Trichinella* (*T. spiralis*, *T. britovi*) stwierdzono również relatywny wzrost ekspresji łańcuchów lambda regionu C immunoglobulin. Podczas syntezy immunoglobulin, łańcuchy lekkie wytwarzane są w nadmiarze (40%) w stosunku do łańcuchów ciężkich i wydzielane jako wolne łańcuchy lekkie (FLC) do surowicy, po czym są szybko metabolizowane i usuwane przez nerki. Dlatego też stężenie FLC w surowicy zależy od równowagi pomiędzy ich produkcją a klirenssem nerkowym (Bradwell 2005). Co ważne, można wskazać kilka funkcji biologicznych FLC, m.in. wykazują one aktywność antyangiogenną, proteolityczną, aktywującą dopełniacz, biorą również udział w aktywacji komórek tucznych (Thio i wsp. 2008). Wykazano, że wzrost FLC w surowicy ludzkiej jest obserwowany w przebiegu różnych przewlekłych chorób zapalnych lub autoimmunologicznych. Wyniki badań własnych sugerują, że przedłużona inwazja wywołana *Trichinella* i uporczywa stymulacja układu immunologicznego antygenem ES napędzają aktywację komórek B, co skutkuje nadprodukcją poliklonalnych FLC. Ponadto zwiększona ekspresja łańcuchów lambda FLC wyraźnie wskazuje również, że stan zapalny wywołany *Trichinella* w 60 dniu po zarażeniu przeszedł w przewlekłą, ale nadal reaktywną immunologicznie fazę. Wzrost ekspresji lambda FLC, którą stwierdzono w badaniach własnych można zatem uznać za potencjalny biomarker późnej fazy inwazji wywoływanej przez otorbione gatunki *Trichinella*.

Ostatnim zidentyfikowanym białkiem była składowa C3 dopełniacza, której statystycznie istotny wzrost relatywnej ekspresji stwierdzono w surowicy świń zarażonych *T. pseudospiralis*. Badania *in vitro* wykazały, że powierzchnia larw mięśniowych *T. spiralis* wiąże składnik C3 dopełniacza (Kennedy i Kuo 1988). Podobnie, stosując model *in vitro*, Hong i wsp. (1992) wykazali, że różne stadia rozwojowe *Trichinella spiralis*, tj. osobniki dorosłe, larwy nowo narodzone i larwy mięśniowe, są w



stanie aktywować układ dopełniacza głównie drogą alternatywną, w mniejszym zaś stopniu drogą klasyczną. Z kolei badania Stankiewicza i wsp. (1989) w oparciu o model myszy wykazały, że wiązanie C3 z larwami mięśniowymi *T. spiralis* było utrudnione. W innych kompleksowych badaniach Näreaho i wsp. (2009) zaobserwowali silne wiązanie składowej C3 ze stichocytami larw mięśniowych *T. spiralis* i *T. nativa*, a także z częścią mięśniową dorosłych postaci pasożyta, natomiast nie wykazano takiego działania w stosunku do larw nowo narodzonych. Ostatnio, Zhao i wsp. (2017) wykazali również, że kalretikulina, białko wiążące wapń, które zostało zidentyfikowane na powierzchni oraz w produktach wydzielniczych różnych stadiów rozwojowych *T. spiralis*, może wiązać komponent C1q, a w konsekwencji zmniejszać wytwarzanie składowej C3. Co ciekawe, w badaniach własnych nie stwierdzono zmian w poziomie ekspresji składowej C3 dopełniacza w surowicy świń eksperymentalnie zarażonych *T. spiralis* i *T. britovi* w porównaniu z grupą kontrolną, co może wskazywać na inny wzorzec miopatii zapalnej indukowanej przez *T. pseudospiralis* oraz otorbione gatunki *Trichinella*. Należy jednak podkreślić, że z patofizjologicznego punktu widzenia zmiany molekularne, biochemiczne i strukturalne w płynach ustrojowych lub tkankach żywiciela wywołane przez konkretny gatunek *Trichinella* w określonych dniach po zarażeniu mogą nie odpowiadać zaburzeniom wywołanym przez inny gatunek *Trichinella* w tym samym punkcie czasowym. Przykładem może być różny czas potrzebny do wytworzenia torebki kolagenowej w mięśniach prądkowanych gospodarza przez różne otorbione gatunki *Trichinella* lub zmienność w kinetyce przeciwciał anti-*Trichinella* IgG wywołana ekspozycją świń na różne gatunki włośni. Podobnie, stosując technikę Western blot, Gómez-Moralez i wsp. (2012) zaobserwowali różnice we wzorcach rozpoznawania przez surowice świń zarażonych różnymi gatunkami włośni antygenów somatycznych pozyskanych z larw mięśniowych *Trichinella spiralis*. Ponadto badania przeprowadzone przez Bruschi i wsp. (2009) również wykazały różnice w odpowiedzi zapalnej gospodarza na otorbione i nieotorbione gatunki *Trichinella*. Z drugiej strony, stwierdzone w badaniach własnych, różnice w surowiczym proteomie świń zarażonych różnymi gatunkami *Trichinella*, obejmujące często unikalne dla poszczególnych grup świń białka, których ekspresja różniła się w stosunku do grupy kontrolnej mogą wynikać z różnych dawek stosowanych do zarażenia świń oraz różnej intensywności inwazji larw w mięśniach zarażonych zwierząt.

Podsumowując, w pracy pt. „Comparative proteomic analysis of serum from pigs experimentally infected with *Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi*, and *Trichinella pseudospiralis*” dokonano pierwszej na świecie próby oceny zmian w surowiczym proteomie świń zarażonych trzema różnymi gatunkami *Trichinella*, w dwóch różnych fazach inwazji. Wyniki przeprowadzonych badań dowodzą, że zarażenie *T. spiralis*, *T. britovi* i *T. pseudospiralis* indukuje zmiany w profilu proteomicznym surowicy świń. Przebieg tych zmian zależy od gatunku *Trichinella* wywołującego inwazję oraz od fazy zarażenia. Ponadto w przypadku świń doświadczalnie zarażonych otorbionymi gatunkami *Trichinella*, zaobserwowano, że zmiany w relatywnej ekspresji białek surowicy (wzrost/spadek) w 60 dniu po zarażeniu charakteryzowały się większym nasileniem (w porównaniu do grupy kontrolnej, średnia zmiana relatywnej ekspresji białek wyniosła 10,04 i 10,45 dla grupy świń zarażonych odpowiednio *T.*

*spiralis* i *T. britovi*) w porównaniu do dnia 13 po zarażeniu (w porównaniu do grupy kontrolnej średnia zmiana wynosiła 2,84 i 1,33 dla świń zarażonych odpowiednio *T. spiralis* i *T. britovi*). Zjawisko to wskazuje na progresję choroby i sugeruje, że pozajelitowa faza inwazji, charakteryzująca się obecnością w pełni uformowanych i otorbionych larw włośni w mięśniach prążkowanych żywiciela, indukuje znacznie silniejsze zmiany w proteomie surowicy zarażonych świń. Badania własne wykazały również, że zarażenie *Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi* i *Trichinella pseudospiralis* powoduje zaburzenia metabolizmu lipidów objawiające się obniżeniem ekspresji Apo A-I, Apo E lub Apo J w surowicy zarażonych świń we wczesnej lub późnej fazie inwazji. Wykazano także, że w zależności od gatunku *Trichinella* wywołującego inwazję, zmiany ekspresji dotyczyły białek uczestniczących w odpowiedzi immunologicznej, reakcji zapalnej, procesie krzepnięcia krwi, produkcji kolagenu i różnicowaniu komórek mięśniowych. Ponadto kilka białkowych spotów, w szczególności tych, których relatywna ekspresja istotnie różniła się w grupach zarażonych świń w porównaniu do grupy kontrolnej, nie zostało zidentyfikowanych przy użyciu spektrometrii MALDI-TOF. W celu lepszego zrozumienia patomechanizmu choroby, interakcji pomiędzy żywicielem a pasożytem oraz identyfikacji nowych surowiczych biomarkerów trichinellozy świń konieczne są zatem dalsze badania z wykorzystaniem bardziej zaawansowanych technik proteomicznych.

Praca 4.2.2. Gondek M., Knysz P., Pomorska-Mól M., Ziomek M., Bień-Kalinowska J. (2020). Acute phase protein pattern and antibody response in pigs experimentally infected with a moderate dose of *Trichinella spiralis*, *T. britovi*, and *T. pseudospiralis*. Veterinary Parasitology, 288, 109277.

Nowoczesna praktyka weterynaryjna, zwłaszcza ta związana z hodowlą świń, wykorzystuje różne narzędzia do monitorowania i oceny stanu zdrowia zwierząt na poziomie stada. Jednym z takich narzędzi, opracowanym w ostatnich latach, jest pomiar surowiczego stężenia wybranych białek ostrej fazy (APP). Odpowiedź ostrej fazy to wrodzona reakcja immunologiczna organizmu, która pojawia się wkrótce po uszkodzeniu tkanek, w przebiegu m.in. urazu, stanu zapalnego czy wzrostu guza. Białka ostrej fazy są syntetyzowane w wątrobie, a ich produkcja stymulowana jest przez takie cytokiny jak IL-1 i 6 (Petersen i wsp. 2004). Z diagnostycznego punktu widzenia, spośród wielu pozytywnych APP, które występują u świń, najistotniejszą rolę odgrywają haptoglobina (Hp), białko C-reaktywne (CRP), surowiczy amyloid A (SAA) oraz główne białko ostrej fazy świń (Pig-MAP). Liczne badania wykazały, że stężenie białek ostrej fazy w surowicy świń wzrasta istotnie w przebiegu wielu różnych chorób wirusowych, bakteryjnych oraz pasożytniczych. Ponadto wyniki badań, opublikowanych najczęściej jako opis przypadku, wskazują, że stężenie białka CRP wzrasta również w surowicy ludzi zarażonych *Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi* oraz *Trichinella* T9 (Clausen i wsp. 1996; Gvozdenovic i wsp. 2014; Paraličová i wsp. 2013; Popović-Dragonjić i Kocić 2018; Tada i wsp. 2018; Tint i wsp. 2018). Wcześniejsze wyniki badań własnych (**publikacja 4.2.1**) wykazały, że zarażenie różnymi gatunkami *Trichinella* wywołuje zmiany w surowiczym proteomie u świń, jednak kilka białek, których ekspresja

istotnie różniła się w surowicy zarażonych włośniami zwierząt w stosunku do niezarażonej grupy kontrolnej, nie zostało zidentyfikowanych. Biorąc powyższe pod uwagę oraz brak w dostępnej literaturze informacji dotyczących wpływu zarażenia świń różnymi gatunkami *Trichinella* na surowiczy poziom Hp, CRP, SAA i Pig-MAP, pierwszym celem pracy było przeanalizowanie kinetyki zmian stężeń Hp, CRP, SAA i Pig-MAP w surowicy świń doświadczalnie zarażonych *T. spiralis* (1000 *T. spiralis*/świnie; n=6), *T. britovi* (3000 *T. britovi*/świnie; n=6) i *T. pseudospiralis* (2000 *T. pseudospiralis*/świnie; n=6) w różnych fazach inwazji (tj. w dniu 6, 13, 20, 30, 45 oraz 62 po zarażeniu) podczas 62 dniowego cyklu badawczego. W drugiej części doświadczenia dokonano oceny kinetyki produkcji przeciwciał IgG i IgM przeciwko antygenom ES larw mięśniowych *Trichinella* w odpowiedzi na zarażenie świń różnymi gatunkami włośni jak również oceniono przydatność testu ELISA typu „in-house” opartego na homologicznym (pozyskanym z tego samego gatunku włośni którym zarażono świnie) i heterologicznym (pozyskanym od *T. spiralis*) antygenie ES larw mięśniowych włośni oraz komercyjnego zestawu ELISA PrioCHECK® *Trichinella* Ab do wykrywania trichinellozy u świń. Oznaczenia poziomu przeciwciał anti-*Trichinella* IgG przeprowadzono w 6, 13, 20, 30, 36, 45 i 62 dniu po zarażeniu, zaś poziom przeciwciał anti-*Trichinella* IgM badano w 6, 13, 15, 20, 30, 45 i 62 dniu po zarażeniu.

Pomimo najniższej dawki włośni zastosowanej do doświadczalnego zarażenia świń, najwyższą intensywność inwazji larw stwierdzono w mięśniach zwierząt zarażonych *T. spiralis*. Wyniki badań własnych potwierdziły zatem, że *T. spiralis* charakteryzuje się największą inwazyjnością dla rodzimych ras świń (średnia intensywność inwazji w przeponie, języku i mięśniach żwaczach wynosiła w grupie świń zarażonych *T. spiralis* 80.10 larw *T. spiralis*/g), podczas gdy inwazyjność *T. britovi* i *T. pseudospiralis* jest umiarkowana (średnia intensywność inwazji w przeponie, języku i mięśniach żwaczach wynosiła 34.47 i 24.69 larw/gram w grupie świń zarażonych odpowiednio *T. britovi* i *T. pseudospiralis*).

W badaniach własnych nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w stężeniu białka CRP w surowicy pomiędzy świniami zarażonymi *T. spiralis* (średnie stężenie CRP w zakresie od  $20.423 \pm 7.559$   $\mu\text{g/ml}$  w 6 dniu po zarażeniu do  $30.320 \pm 13.446$   $\mu\text{g/ml}$  w dniu 30 po zarażeniu) a świniami kontrolnymi przez cały okres trwania doświadczenia. Podobnie nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w stężeniu białka CRP w surowicy świń kontrolnych i świń doświadczalnie zarażonych *T. pseudospiralis* (średnie stężenie w zakresie od  $21.367 \pm 2.095$   $\mu\text{g/ml}$  w 45 dniu po zarażeniu do  $32.257 \pm 9.475$   $\mu\text{g/ml}$  w 20 dniu po zarażeniu). Surowicze stężenie CRP wykazało natomiast statystycznie istotny wzrost tylko u świń zarażonych *T. britovi* w 6 dniu po zarażeniu ( $38.983 \pm 16.518$   $\mu\text{g/ml}$ ; test *t*-Studenta;  $t = 3.167$ ;  $df = 10$ ;  $P = 0.01$ ), po czym koncentracja tego białka powróciła do wartości nieróżniących się istotnie od tych, które obserwowano w grupie zwierząt kontrolnych. W badaniach własnych nie zaobserwowano również zmian w surowiczym stężeniu Hp pomiędzy świniami zarażonymi *T. spiralis* (średnią wartość stężenia Hp w zakresie od  $0.483 \pm 0.136$   $\text{mg/ml}$  w dniu 6 po zarażeniu do  $0.774 \pm 0.465$   $\text{mg/ml}$  w 20 dniu po zarażeniu) i *T. britovi* (średnie stężenie Hp w zakresie

od  $0.526 \pm 0.275$  mg/ml w 6 dniu po zarażeniu do  $0.639 \pm 0.202$  mg/ml w dniu 13 po zarażeniu) a grupą zwierząt kontrolnych. Statystycznie istotny wzrost surowiczej koncentracji Hp odnotowano tylko w grupie świń zarażonych *T. pseudospiralis* (test *t*-Studenta;  $t = 4.264$ ;  $df = 10$ ;  $P = 0.002$ ) w 62 dniu po zarażeniu ( $0.829 \pm 0.104$  mg/ml). Z kolei stężenie Pig-MAP utrzymywało się na stabilnym, niezmiennym poziomie w surowicy świń zarażonych *T. spiralis* (średnie stężenie w zakresie od  $0.701 \pm 0.236$  mg/ml w dniu 30 po zarażeniu do  $1.046 \pm 0.301$  mg/ml w 13 dniu po zarażeniu) i *T. pseudospiralis* (średnie stężenie w zakresie od  $0.623 \pm 0.171$  mg/ml w 30 dniu po zarażeniu do  $1.226 \pm 0.306$  mg/ml w 13 dniu po zarażeniu) przez cały okres trwania doświadczenia. W porównaniu do zwierząt kontrolnych statystycznie istotny wzrost surowiczego stężenia Pig-MAP stwierdzono tylko u świń zarażonych *T. britovi* w 6 dniu inwazji ( $1.338 \pm 0.153$  mg/ml; test *t*-Studenta;  $t = 4.624$ ;  $df = 10$ ;  $P = 0.001$ ). Po tym krótkotrwałym wzroście, koncentracja Pig-MAP powróciła do poziomu obserwowanego w surowicy grupy kontrolnej i utrzymywała się na tym poziomie do 62 dnia po zarażeniu. Stężenie SAA było poniżej granicy wykrywalności (LOD) we wszystkich grupach świń przez większość dni doświadczenia.

Wyniki przeprowadzonych badań sugerują zatem, że koncentracja CRP i Pig-MAP może wzrastać we wczesnej, jelitowej fazie inwazji, ale wzrost ten koreluje z wielkością dawki włośni, którą zostały zarażone świnię. W opisywanym doświadczeniu, mając na uwadze różne wartości wskaźnika RCI poszczególnych gatunków *Trichinella*, zastosowano trzy różne umiarkowane dawki pasożyta (1000-3000 larw *Trichinella*) w celu uzyskania porównywalnej intensywności inwazji włośni w mięśniach zarażonych świń. W efekcie, spośród trzech grup doświadczalnych, w grupie świń zarażonych *T. britovi* największa liczba larw mięśniowych osiągnęła jelita, a następnie przekształciła się w kolejne stadia rozwojowe L2-L4 i ostatecznie w osobniki dorosłe. Większa zatem ekspozycja żywiciela na antygeny wydzielniczo-wydalnicze i powierzchniowe postaci larwalnych oraz osobników dorosłych włośni bytujących w jelitach może wzbudzać silniejszą produkcję cytokin takich jak IL-1, IL-6 oraz TNF- $\alpha$ , a w konsekwencji indukcję produkcji APP. Mechanizm ten może tłumaczyć krótkotrwały wzrost stężenia CRP i Pig-MAP w surowicach świń zarażonych *T. britovi*. Z kolei wzrost surowiczego stężenia Hp, w późnej fazie inwazji (62 dniu po zarażeniu) u świń zarażonych *T. pseudospiralis* jest trudny do wytłumaczenia, lecz może wskazywać na inny mechanizm odpowiedzi immunologicznej żywiciela podczas miopatii zapalnej wywołanej przez otorbione i nieotorbione genotypy włośni. Wyniki badań własnych wskazują jednak, że pomiar stężenia białek ostrej fazy takich jak CRP, Hp, Pig-MAP i SAA nie nadaje się do badań monitoringowych stad świń w kontekście zarażeń *Trichinella* spp. Surowicze stężenie żadnego z ocenianych APP nie wzrosło we wszystkich grupach doświadczalnych w tym samym dniu/dniach po zarażeniu, a wzrost koncentracji poszczególnych APP w poszczególnych grupach świń był krótkotrwały.

W drugiej części badań wykazano, stosując analizę ROC, że wartość diagnostyczna testów „in-house” ELISA oraz testu komercyjnego PrioCHECK<sup>®</sup> *Trichinella* Ab była porównywalna. Parametry czułości, swoistości, wartości predykcyjnej dodatniej (PPV), wartości predykcyjnej ujemnej (NPV) i

współczynnika Kappa dla testu „in-house” ELISA opartego na antygenie ES *T. spiralis* osiągnęły następujące wartości: czułość 0.982; specyficzność 0.974; PPV 0.903; NPV 0.995 oraz współczynnik Kappa 0.927. Czułość, specyficzność, PPV, NPV i współczynnik Kappa dla testów „in-house” ELISA opartych na antygenie ES larw mięśniowych *T. britovi* i *T. pseudospiralis* wynosiły z kolei odpowiednio 0.943; 0.962; 0.846; 0.986; 0.866.

W badaniach własnych wykazano, że specyficzne przeciwciała IgG przeciwko antygenom ES larw mięśniowych *Trichinella* wykryto po raz pierwszy stosując komercyjny test ELISA (PrioCHECK<sup>®</sup> *Trichinella* Ab) oraz test „in-house” ELISA oparty na antygenie ES larw mięśniowych *T. spiralis* w 30 dniu po zarażeniu u świń zarażonych *T. spiralis* oraz w 36 dniu po zarażeniu u zwierząt zarażonych *T. britovi* i *T. pseudospiralis* (wzrost wartości gęstości optycznej surowicy powyżej punktu odcięcia). Stosując natomiast test ELISA oparty na antygenie homologicznym, specyficzne przeciwciała anti-*Trichinella* IgG wykrywane były po raz pierwszy w grupie świń zarażonych *T. pseudospiralis* w tym samym dniu, w którym po raz pierwszy zostały one wykryte testem PrioCHECK<sup>®</sup> *Trichinella* Ab i testem „in-house” ELISA opartym na heterologicznym (*T. spiralis*) antygenie ES larw mięśniowych włośni, natomiast w grupie świń zarażonych *T. britovi* serokonwersję wykryto o jedno pobranie surowicy wcześniej (tj. w 30 dniu po zarażeniu) w porównaniu do testu komercyjnego i testu „in-house” ELISA opartego na antygenie ES larw mięśniowych *T. spiralis*. Wyniki badań własnych wskazują zatem, że test ELISA oparty na antygenie ES pozyskanym od tego samego gatunku włośnia, którym zarażone są świny (homologiczny) może charakteryzować się nieznacznie wyższą czułością w porównaniu do testu opartego na antygenie heterologicznym. Wyniki te zgodne są również z badaniami prowadzonymi przez Kapela i Gamble'a (2000). Przyczyną tych obserwacji mogą być różnice w składzie białek ES uwalnianych przez poszczególne gatunki *Trichinella*. Używając narzędzi proteomicznych, wykazano bowiem, że produkty ES uwalniane przez larwy mięśniowe *T. spiralis* i *T. britovi* wykazują nieco inne profile białkowe. W konsekwencji homologiczne antygeny *Trichinella* stosowane w procedurze ELISA mogą prezentować wyższą komplementarność dla przeciwciał wytworzonych przez organizm w odpowiedzi na zarażenie konkretnym gatunkiem włośnia, a co za tym idzie, charakteryzować się większą zdolnością do ich wiązania.

W przeprowadzonych badaniach oceniono również kinetykę produkcji przeciwciał IgG przeciwko antygenom larw mięśniowych *Trichinella* w poszczególnych grupach świń zarażonych różnymi gatunkami włośni. Pierwszy i jedyny statystycznie istotny wzrost poziomu przeciwciał IgG przeciwko antygenom ES larw mięśniowych *T. spiralis* w grupie świń zarażonych *T. spiralis* zaobserwowano pomiędzy 36 a 45 dniem po ich zarażeniu (PrioCHECK<sup>®</sup> *Trichinella* Ab: test sferyczności Mauchly'ego,  $P = 0.673$ ; ANOVA z powtarzаныmi pomiarami,  $F = 28.300$  i  $P = 0.000002$ ; oraz post-hoc test Bonferroni,  $P = 0.0001$ . „In house” ELISA odpowiednio  $P = 0.676$ ;  $F = 7.253$  i  $P = 0.003$ ; oraz  $P = 0.02$ ). Od 45 dnia po zarażeniu poziom przeciwciał anti-*Trichinella* IgG w tej grupie świń utrzymywał się na stabilnym, wysokim poziomie aż do końca trwania doświadczenia (tj. 62 dnia po zarażeniu). U świń zarażonych *T. britovi* statystycznie istotny wzrost poziomu przeciwciał anti-*T.*

*britovi* IgG obserwowano pomiędzy 36 i 45 dniem po zarażeniu gdy zastosowano komercyjny test ELISA lub test „in-house” oparty na antygenie ES larw mięśniowych *T. spiralis* (test sferyczności Mauchly'ego,  $P = 0.548$  i  $P = 0.137$ ; ANOVA z powtarzanymi pomiarami,  $F = 25.564$  i  $P = 0.0001$  oraz  $F = 14.718$  i  $P = 0.001$ ; oraz post-hoc test Bonferroniego,  $P = 0.001$  i  $P = 0.002$  dla odpowiednio testu PrioCHECK® *Trichinella* Ab oraz „in-house” *T. spiralis* ES ELISA) lub pomiędzy 30 i 36 dniem po zarażeniu gdy surowice analizowano testem ELISA opartym na homologicznym (*T. britovi*) antygenie ES (test sferyczności Mauchly'ego,  $P = 0.927$ ; ANOVA z powtarzanymi pomiarami,  $F = 16.113$  i  $P = 0.00006$ ; post-hoc test Bonferroniego,  $P = 0.03$ ). Podobnie jak u świń zarażonych *T. spiralis*, również u świń zarażonych *T. britovi*, od 45 dnia po zarażeniu, przeciwciała anti-*Trichinella* IgG utrzymywały się na stałym, wysokim poziomie aż do końca doświadczenia (62 dzień po zarażeniu). Inną natomiast kinetykę produkcji przeciwciał wykazano u świń zarażonych *T. pseudospiralis*. W tej grupie świń wzrost poziomu anti-*T. pseudospiralis* IgG rozpoczął się 36 dnia po zarażeniu zwierząt i trwał do chwili zakończenia doświadczenia w 62 dniu inwazji (test sferyczności Mauchly'ego,  $P = 0.329$ ,  $P = 0.356$  i  $P = 0.363$ ; ANOVA z powtarzanymi pomiarami,  $F = 67.493$  i  $P = 0.000002$ ,  $F = 47.111$  i  $P = 0.000008$  oraz  $F = 32.947$  i  $P = 0.00004$ ; post-hoc test Bonferroniego,  $P = 0.002$  [dni 36 i 45]/ $P = 0.0002$  [dni 45 i 62],  $P = 0.0006$  [dni 36 i 45]/ $P = 0.009$  [dni 45 i 62] oraz  $P = 0.005$  [dni 36 i 45]/ $P = 0.01$  [dni 45 i 62] dla odpowiednio testu PrioCHECK® *Trichinella* Ab; testu „in-house” ELISA opartego na antygenie ES larw mięśniowych *T. spiralis* oraz testu „in-house” ELISA opartego na antygenie ES larw mięśniowych *T. pseudospiralis*). Wyniki badań wskazują zatem na podobny mechanizm aktywacji odpowiedzi humoralnej u świń w następstwie inwazji wywołanej umiarkowanymi dawkami włośni należącymi do kładu otorbionego oraz odmienny w przypadku zarażenia wywołanego *T. pseudospiralis* (kład nieotorbiony). Różnice w produkcji przeciwciał anti-*Trichinella* IgG pomiędzy grupą świń zarażonych *T. spiralis*/*T. britovi* a grupą zwierząt zarażonych *T. pseudospiralis* mogą być związane z pewnymi cechami charakterystycznymi dla danego gatunku włośni takimi jak czas potrzebny do zakończenia wzrostu larw w mięśniach gospodarza i wytworzenia przez nie w pełni funkcjonalnych stichosomów, a w konsekwencji różnicami w ilości i strukturze produktów ES uwalnianych przez larwy do krwiobiegu żywiciela w poszczególnych dniach po zarażeniu.

Ostatnim etapem badań, których wyniki opublikowano w **pracy 4.2.2** była ocena poziomu przeciwciał IgM przeciwko antygenom ES larw mięśniowych włośni. Statystycznie istotny wzrost poziomu anti-*Trichinella* IgM w porównaniu do grupy kontrolnej stwierdzono tylko w surowicy świń zarażonych *T. spiralis* w 30 dniu po ich zarażeniu (test *t*-Studenta;  $t = 2.762$ ;  $df = 10$ ;  $P = 0.02$ ). Następnie obserwowano spadek w ich poziomie, lecz 45 dnia po zarażeniu był on nadal istotnie wyższy w porównaniu do niezarażonych zwierząt kontrolnych. Nie zaobserwowano natomiast statystycznie istotnych zmian w poziomie przeciwciał anti-*Trichinella* IgM w surowicy świń zarażonych *T. britovi* i *T. pseudospiralis* przez cały okres trwania doświadczenia. Na podstawie wyników badań własnych oraz danych w dostępnej literaturze (Wang i wsp. 2020) należy stwierdzić, że produkcja przeciwciał IgM przeciwko antygenom ES larw mięśniowych *Trichinella* jest zróżnicowana i zależy od kilku czynników

takich jak: gatunek włośnia wywołującego inwazję, dawka włośni użyta do zarażenia oraz gatunek żywiciela. Powszechnie wiadomo, że w przebiegu większości infekcji przeciwciała klasy M pojawiają się wcześniej niż immunoglobuliny klasy G. W badaniach własnych produkcja przeciwciał anti-*Trichinella* IgM była opóźniona, a ich wzrost zaobserwowano tylko w grupie świń zarażonych *T. spiralis* w późnej, mięśniowej fazie inwazji. Uzyskane jednak wyniki są częściowo zgodne z wynikami badań prowadzonych przez Wanga i wsp. (2020), którzy wykazali, że serokonwersja IgM przeciwko antygenom ES larw mięśniowych *Trichinella* u świń zarażonych umiarkowanymi dawkami *T. spiralis* jest przedłużona i zachodzi na fazę mięśniową inwazji. Niewykrycie natomiast przeciwciał anti-*Trichinella* IgM w surowicy świń zarażonych *T. britovi* i *T. pseudospiralis* może być efektem niższej, w porównaniu do *T. spiralis*, inwazyjności tych dwóch gatunków włośni dla świń. Należy podkreślić również, że przedstawione wyniki badań własnych są pierwszą na świecie próbą oceny kinetyki produkcji anti-*Trichinella* IgM u świń zarażonych *T. britovi* i *T. pseudospiralis*. Niewątpliwie jednak, aby w pełni zrozumieć mechanizm produkcji przeciwciał anti-*Trichinella* IgM oraz ocenić ich ewentualną przydatność w przyżyciowej diagnostyce włośnicy świń, konieczne jest podjęcie dalszych badań, z wykorzystaniem różnych dawek *T. britovi* i *T. pseudospiralis* do zarażenia świń oraz różnych poziomów intensywności inwazji *T. britovi* i *T. pseudospiralis* w mięśniach zarażonych zwierząt.

Podsumowując, w pracy pt. „Acute phase protein pattern and antibody response in pigs experimentally infected with a moderate dose of *Trichinella spiralis*, *T. britovi*, and *T. pseudospiralis*” wykazano, że pozytywne białka ostrej fazy, takie jak CRP, Hp, Pig-MAP i SAA, nie mogą być wykorzystywane jako przesiewowe narzędzie do przyżyciowego monitorowania zarażeń świń umiarkowanymi dawkami *T. spiralis*, *T. britovi* oraz *T. pseudospiralis*. Podobnie ocena poziomu przeciwciał IgM przeciwko antygenom ES larw mięśniowych *Trichinella* ma również ograniczoną wartość diagnostyczną u świń zarażonych *Trichinella* spp. Ich wzrost nie został udowodniony we wczesnej, jelitowej fazie inwazji, w związku z czym pomiar anti-*Trichinella* IgM nie powinien być traktowany jako rutynowe narzędzie diagnostyczne, uzupełniające procedurę wykrywania trichinellozy świń opartą na pomiarze przeciwciał anti-*Trichinella* IgG. Specyficzne przeciwciała IgG przeciwko antygenom ES larw mięśniowych *Trichinella* zostały po raz pierwszy wykryte w teście ELISA w 30 (u świń zarażonych *T. spiralis*); w zależności od rodzaju testu ELISA, w 30 lub 36 (u świń zarażonych *T. britovi*); oraz 36 (u świń zarażonych *T. pseudospiralis*) dniu po zarażeniu świń, a wyniki te są typowe dla umiarkowanych dawek stosowanych do zarażenia świń w warunkach doświadczalnych. Ponadto zastosowanie antygeny ES pozyskanego z larw włośni tego samego gatunku, którym zarażone są świnię (antygen homologiczny) może przyczynić się do podwyższenia czułości testu ELISA w zakresie wykrywania anti-*Trichinella* IgG u tych zwierząt.

Praca 4.2.4. Gondek M., Grzelak S., Pyz-Łukasik R., Knysz P., Ziomek M., Bień-Kalinowska J. (2022). *Insight into Trichinella britovi* infection in pigs: effect of various infectious doses on larvae density and spatial larvae distribution in carcasses and comparison of the detection of anti-*T.britovi* IgG of three different commercial ELISA tests and immunoblot assay. Pathogens, 11(7), 735

*T. britovi* charakteryzuje się szerokim rozprzestrzenieniem geograficznym, a głównymi naturalnymi żywicielami dla tego gatunku włośnia są dzikie zwierzęta drapieżne żyjące w umiarkowanych strefach Europy, zachodniej Azji oraz północnej i zachodniej Afryki (Pozio i wsp. 2009). Cykl transmisji *T. britovi* jest zatem leśny (sylwaticzny); jednak udowodniono, że pasożyt ten może być również przenoszony ze zwierząt dzikich na świnie (Pozio i wsp. 2009). Transmisja taka jest szczególnie możliwa na obszarach, na których świnie utrzymywane są w warunkach chowu przydomowego, wolnowybiegowego lub w systemach hodowli ekologicznej, które umożliwiają im kontakt z innymi dzikimi zwierzętami oraz gryzoniami. Biorąc pod uwagę wysoką prevalencję zarażenia włośniami lisów w Polsce (4%), z dominującym gatunkiem *T. britovi* (Bilska-Zajac i wsp. 2020), oraz fakt, że inwazje *Trichinella* u świń w Polsce wykrywane są najczęściej w małych gospodarstwach o niskim poziomie bioasekuracji i o liczbie zwierząt w stadzie nie większej niż 35 (Bilska-Zajac i wsp. 2019), należy przypuszczać, że *T. britovi* może zwiększyć swój ilościowy udział w naturalnych zarażeniach świń włośniami. Wyniki badań przeprowadzonych przez naukowe ośrodki niemieckie, włoskie oraz duńskie wykazały, że *T. britovi* charakteryzuje się niską inwazyjnością dla świń domowych i szczurów (Kapel i wsp. 1998; Malakauskas i wsp. 2001; Nöckler i wsp. 2005; Pozio i wsp. 2020). Pozwoliło to na sformułowanie wniosków, że rozprzestrzenianie się tego pasożyta w gospodarstwie w łańcuchu zarażenia świnia-świnia lub szczur-świnia jest utrudnione, a ogniska *T. britovi* u świń są krótkotrwałe i ograniczają się do jednego tylko pokolenia hodowanych zwierząt. Wyniki badań własnych przedstawione w **publikacji 4.2.2** wykazały jednak, że umiarkowane dawki *T. britovi* były w stanie wywołać włośnicę u świń o intensywności inwazji stwarzającej zagrożenie dla zdrowia publicznego (średnia intensywność inwazji > 1 larwa w 1 gramie tkanki mięśniowej) i mogącej rozprzestrzenić się na inne osobniki w stadzie. Ze względu na szerokie rozpowszechnienie *T. britovi* w Europie wśród różnych gatunków dzikich zwierząt mięso- i wszystkożernych, możliwość transmisji pasożyta od zwierząt dzikich do hodowlanych świń oraz poważne, udokumentowane przypadki włośnicy wywołanej przez *T. britovi* u ludzi (Gomez-Garcia i wsp. 2003; Akkoc i wsp. 2009; Pavic i wsp. 2020), gatunek ten powinien być traktowany priorytetowo w koncepcji „One Health” w zakresie odzwierzęcych pasożytów przenoszonych przez żywność.

W celu lepszego zatem poznania i zrozumienia przebiegu włośnicy u rodzimych ras świń wywołanej umiarkowanymi dawkami wyizolowanego w Polsce szczepu *T. britovi* oraz oceny przydatności różnych testów serologicznych do wykrywania inwazji *Trichinella britovi* u świń, w badaniach własnych dokonano: (i) oceny i porównania intensywności inwazji i rozmieszczenia larw *T. britovi* w 15 różnych mięśniach lewej i prawej strony tusz świń zarażonych doświadczalnie dwoma



różnymi, umiarkowanymi dawkami (3000 *T. britovi*/świnie; n=6 i 5000 *T. britovi*/świnie; n=8) *T. britovi*; (ii) oceny przydatności różnych, dostępnych na rynku europejskim i opartych na antygenach wydzielniczo-wydalniczych (ES) larw mięśniowych *Trichinella* komercyjnych zestawów ELISA do wykrywania anty-*T. britovi* IgG w surowicy świń zarażonych dawką 5000 larw *T. britovi*; (iii) oceny kinetyki produkcji przeciwciał anty-*T. britovi* IgG (wzrost i/lub spadek produkcji) w krótkich interwałach czasowych podczas 62-dniowego cyklu badawczego; (iv) identyfikacji białek antygeny ES larw mięśniowych *T. britovi* reagujących z surowiczymi anty-*Trichinella* IgG u świń zarażonych *T. britovi* w teście Western blot oraz (v) porównania testu Western blot opartego na antygenie ES larw mięśniowych *T. britovi* i komercyjnych testów ELISA pod względem wykrywania swoistych przeciwciał anty-*T. britovi* IgG w surowicy zarażonych świń.

W badaniach własnych, w grupie świń zarażonych zarówno dawką 3000 jak i 5000 larw *T. britovi* najwyższą intensywność inwazji stwierdzono w filarach przepony i z wyjątkiem języka różniła się ona statystycznie istotnie ( $P < 0.05$ ) w porównaniu do intensywności inwazji włośni w pozostałych 13 badanych mięśniach lub grupach mięśni (tj. mięśniach żwaczach, mięśniach skrzydłowych, mięśniach międzybrowowych, mięśniach brzucha, mięśniu najdłuższym klatki piersiowej, mięśniach szyi, mięśniach lędźwiowych, mięśniu trójgłowym ramienia, mięśniu dwugłowym uda, mięśniach prostownikach przedramienia, mięśniach zginaczach przedramienia, mięśniach prostownikach podudzia i mięśniach zginaczach podudzia). Wynik ten wskazuje, że u zarażonych świń mechanizm migracji larw *T. britovi* do mięśni szkieletowych jest podobny do *T. spiralis*, a filary przepony powinny być traktowane jako miejsce predylekcyjne podczas urzędowego badania tusz świń w kierunku włośni. Niedawne zmiany w Rozporządzeniu (UE) 1375/2015 wprowadziły normę ISO 18743:2015, w której szczegółowo opisano referencyjną metodę wykrywania larw *Trichinella* w mięsie oraz procedurę pobierania próbek od poszczególnych gatunków zwierząt. Zgodnie z tym dokumentem, w przypadku urzędowego badania świń domowych na obecność włośni, próbki mięśni o masie nie mniejszej niż 1 g należy pobrać z filarów przepony lub mięśni żwaczy. Wyniki badań własnych wykazały jednak, że średnia intensywność inwazji włośni w mięśniach żwaczach świń zarażonych dawką 3000 i 5000 larw *T. britovi* wynosiła odpowiednio 51.93% i 36.11% intensywności inwazji obserwowanej w filarach przepony. Trudno spekulować, czy te same proporcje byłyby zachowane przy intensywności inwazji *T. britovi* w filarach przepony na poziomie czułości referencyjnej metody wytrawiania tkanki mięśniowej (tj. 1 larwa/1 gram filarów przepony), lecz uzyskane wyniki wskazują, że mięśnie żwacze nie powinny być traktowane jako równoważne w stosunku do lędźwiowej części przepony pod względem wykrywalności larw *Trichinella* u świń oraz że masa próbek pobranych z mięśni zuchwowych powinna być proporcjonalnie zwiększona, szczególnie podczas tworzenia próby zbiorczej, w której każda tusza reprezentowana jest przez próbkę o masie 1 g.

W badaniach własnych wykazano również, że intensywność inwazji włośni w mięśniach tusz świń zarażonych dawką 3000 *T. britovi* nie różniła się istotnie od intensywności inwazji *Trichinella* w mięśniach tusz świń zarażonych dawką 5000 *T. britovi*. Przyjmuje się, że intensywność inwazji larw

*Trichinella* w mięśniach zarażonych zwierząt koreluje z dawką włośni użytą do zarażenia. Współzależności takie jednak obserwowane są przede wszystkim, gdy dawki należą do różnych kategorii określanych w literaturze jako niskie (100–300 larw *Trichinella*), umiarkowane (2000–6000 larw *Trichinella*) lub wysokie (10 000–20 000 larw *Trichinella*). Dawki różnych kategorii indukują zatem znaczne różnice w intensywności inwazji włośni w mięśniach zarażonych zwierząt, w tym świń, w przypadku jednak różnych dawek należących do tej samej kategorii takich zależności w badaniach własnych nie stwierdzono. Zjawisko to prawdopodobnie związane jest z silniejszą lokalną odpowiedzią immunologiczną, spowodowaną wyższą dawką pasożyta użytą do zarażenia świń, a w konsekwencji szybszym wydalaniem larw oraz osobników dorosłych włośni z jelit zarażonych zwierząt.

W grupie świń zarażonych dawką 5000 larw *T. britovi*, swoiste przeciwciała IgG przeciwko antygenom ES larw mięśniowych *T. britovi* zostały po raz pierwszy wykryte przy pomocy wszystkich trzech komercyjnych testów ELISA w 36 dniu po zarażeniu. Wyniki badań indywidualnych świń wykazały jednak pewne różnice w wykrywalności przeciwciał anti-*T. britovi* IgG pomiędzy poszczególnymi zestawami ELISA. Powszechnie wiadomo, że czułość testów serologicznych zależy od czasu, jaki upłynął od zarażenia zwierzęcia patogenem do wykonania badania. W 36 dniu po zarażeniu świń czułość testów ELISA PrioCHECK® *Trichinella* Ab i Pigtype® *Trichinella* Ab wynosiła 62.5% (95% CI: 24.49–91.48) a w przypadku zestawu ID Screen® *Trichinella* wynosiła ona 50% (95% CI: 15.7–84.30). W 41 dniu po zarażeniu, czułość testów ELISA wynosiła 100% (95% CI: 63.06–100), 87.5% (95% CI: 47.35–99.68) i 75% (95% CI: 34.91–96.81) odpowiednio dla zestawów Pigtype® *Trichinella* Ab, PrioCHECK® *Trichinella* Ab oraz ID Screen® *Trichinella* Indirect Multi-species. Różnice w klasyfikacji poszczególnych świń jako pozytywne (w surowicy których wykryto przeciwciała anti-*Trichinella* IgG), wątpliwe lub negatywne (w surowicy których nie wykryto przeciwciał anti-*Trichinella* IgG) przez poszczególne testy ELISA w 36 i 41 dniu po zarażeniu mogą być związane z różnicami w konstrukcji tych odczynników, m.in produkcją antygeny ES, sposobem wyznaczenia linii odcięcia przez producenta lub rodzajem użytego przeciwciała drugorzędowego. Należy również podkreślić, że różnice pomiędzy testami ELISA w wykrywaniu anti-*Trichinella* IgG u poszczególnych świń dotyczyły nie więcej niż jednego tylko pobrania krwi. Ponieważ próbki surowicy pobierano w interwałach 2–6 dniowych, można założyć, że zestaw ELISA, który sklasyfikował świnie jako negatywne, podczas gdy pozostałe testy ELISA sklasyfikowały je jako pozytywne, oceniłby je również jako dodatnie nawet następnego dnia badania. W badaniach własnych wykazano również wysoką korelację pomiędzy ocenianymi zestawami ELISA zarówno dla wyników poszczególnych świń (współczynnik korelacji rang Spearmana w zakresie od 0.725 do 0.963;  $P < 0.05$ ), jak również dla całego modelu doświadczalnego (współczynnik korelacji rang Spearmana w zakresie od 0.903 do 0.912;  $P < 0.05$ ). Z praktycznego punktu widzenia należy jednak zwrócić szczególną uwagę na wyniki wątpliwe lub, jeżeli konstrukcja testu ELISA umożliwia otrzymanie wyników tylko pozytywnych lub negatywnych, na próbki surowic, dla których wartość indeksu ELISA (SP, SP% lub PP) bliska jest wartości linii odcięcia (90% wartości punktu odcięcia i powyżej). W takim przypadku świnie powinny

zostać ponownie przebadane, a badanie takie może być wykonane w krótkim odstępie czasu, tj. 2-5 dni po uzyskaniu wyniku wątpliwego.

W badaniach własnych wykazano również, że statystycznie istotny wzrost poziomu przeciwciał anti-*T. britovi* IgG w surowicy świń zarażonych dawką 5000 *T. britovi* wystąpił po raz pierwszy pomiędzy dniem 36 i 41 po zarażeniu ([1] **PrioCHECK® Trichinella Ab**: test sferyczności Mauchly'ego,  $P < 0.0001$ ; ANOVA z powtarzanymi pomiarami i korektą Huynha-Feldta,  $P = 0.0002$ ; oraz post-hoc test Bonferroniego,  $P = 0.006$ . [2] **ID Screen® Trichinella Indirect Multi-species ELISA**: test sferyczności Mauchly'ego,  $P < 0.0001$ ; ANOVA z powtarzanymi pomiarami i korektą Huynha-Feldta,  $P = 0.005$ ; oraz post-hoc test Bonferroniego,  $P = 0.002$ . [3] **Pigtype® Trichinella Ab ELISA**: test sferyczności Mauchly'ego,  $P < 0.001$ ; ANOVA z powtarzanymi pomiarami i korektą Huynha-Feldta,  $P < 0.0001$ ; oraz post-hoc test Bonferroniego,  $P < 0.0001$ ). Od 45 dnia produkcja anti-*T. britovi* IgG osiągnęła fazę plateau i przeciwciała te utrzymywały się na stałym, wysokim poziomie do końca doświadczenia (62 dnia po zarażeniu). Podobną kinetykę produkcji przeciwciał anti-*T. britovi* IgG zaobserwowano w surowicy świń zarażonych dawką 3000 larw *T. britovi* (**publikacja 4.2.2**). Ponadto nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w surowiczym poziomie przeciwciał anti-*T. britovi* IgG pomiędzy grupami świń zarażonych dawką 3000 i 5000 larw *T. britovi* w 36 i 45 dniu inwazji ( $P > 0.05$ ), lecz różnice takie stwierdzono w 62 dniu po zarażeniu zwierząt ( $P < 0.05$ ). Zjawisko to jest trudne do wyjaśnienia, ponieważ intensywność inwazji larw *T. britovi* w mięśniach tusz w obydwu grupach doświadczalnych świń nie różniła się istotnie. Ponadto różnice w poziomie anti-*T. britovi* IgG pomiędzy grupą świń zarażonych dawką 3000 a grupą zarażoną 5000 larw *T. britovi* obserwowano tylko w późnej, parenteralnej fazie zarażenia, co wyklucza również jakkolwiek wpływ różnic w wielkości dawki użytej do zarażenia zwierząt. Przypuszczać zatem należy, że istnieją inne endogenne czynniki związane z gospodarzem, które w nieznanym sposobie regulują ilość produktów białkowych wydalananych lub wydzielanych przez pasożyta do krwiobiegu żywiciela, a które to produkty stymulują następnie jego układ odpornościowy z różnym nasileniem. Potwierdza to również zaobserwowany w badaniach własnych brak korelacji między intensywnością inwazji larw *T. britovi* w różnych mięśniach zarażonych świń a poziomem anti-*T. britovi* IgG w 41, 51 i 62 dniu inwazji.

W kolejnym etapie badań wykazano, że test Western blot oparty na antygenie ES larw mięśniowych *T. britovi* (*T. britovi* ML ES-Western blot) wykazał wysoką zgodność w zakresie wykrywania specyficznych przeciwciał anti-*T. britovi* IgG z wynikami testów ELISA PrioCHECK® Trichinella Ab i Pigtype® Trichinella Ab. U trzech świń natomiast test Western blot wykrył przeciwciała anti-*T. britovi* IgG o jedno pobranie krwi wcześniej niż zestaw ID Screen® Trichinella Indirect Multi-species ELISA. Należy jednak podkreślić, że w przypadku próbek surowic pobranych od tych świń stosując test ID Screen® Trichinella Indirect Multi-species otrzymano wyniki wątpliwe przy stosunkowo wysokich odczytach gęstości optycznej surowic. Ponadto wyniki immunoblottingu potwierdziły różnice w surowiczych poziomach anti-*T. britovi* IgG u świń w poszczególnych dniach inwazji. Intensywność sygnału prążków białkowych antygenów ES larw mięśniowych *T. britovi* reagujących z surowicami

zarażonych świń była wyższa w późnej fazie inwazji (62 dzień po zarażeniu) w porównaniu do dnia serokonwersji. Ponadto wykazano, że surowicze przeciwciała anti-*Trichinella* IgG zarażonych świń reagowały z antygenami ES larw mięśniowych *T. britovi* o masach cząsteczkowych 62, 55 i 52 kDa, a wyniki te zgodne są z wynikami badań przeprowadzonych przez Gómez-Morales i wsp. (2012), którzy stosując test Western blot oparty na antygenie ES larw mięśniowych *T. spiralis* wykazali, że surowice świń zarażonych *T. spiralis* rozpoznają białka ES o masie cząsteczkowej w zakresie 64-72, 59-63 i 48-55 kDa. Wyniki badań własnych wykazały zatem, że zastosowanie w teście Western blot antygeny ES otrzymanego z larw mięśniowych *T. britovi* i próbek surowicy świń zarażonych *T. britovi* nie wpłynęło istotnie na wzór prążków białkowych w porównaniu do wzoru prążków białkowych rozpoznawanych przez surowice świń zarażonych *T. spiralis* w teście Western blot opartym na antygenie ES larw mięśniowych *T. spiralis*. W efekcie należy przyjąć, że do wykrywania włośnicy świń zarażonych różnymi gatunkami *Trichinella* przy użyciu testu Western blot, wystarczającym jest użycie antygenów pozyskanych tylko z jednego gatunku włośnicy, np. *T. spiralis*, którego hodowla w warunkach laboratoryjnych jest najłatwiejsza. W badaniach własnych wykazano również, że profil białek ES larw mięśniowych *T. britovi* rozpoznawanych przez surowice zarażonych świń w teście Western blot był stabilny, bowiem prążki białkowe o masach 62, 55 i 52 kDa, które uwidoczniono w dniu serokonwersji obserwowano również po 20–30 kolejnych dniach (tj. w 62 dniu po zarażeniu). Podobnie nie zaobserwowano dodatkowych prążków białkowych reagujących z anti-*T. britovi* IgG w późnej fazie inwazji (dzień 62 po zarażeniu), których nie uwidoczniono w dniu serokonwersji. Może to wskazywać, że u świń faza inwazji wywołanej *T. britovi* nie wpływa na profil prążków białkowych obserwowanych w teście *T. britovi* ML ES-Western blot. W związku z tym do celów badań walidacyjnych testu Western blot wystarczy stosować próbki surowic pobrane od zwierząt w dowolnym, pojedynczym dniu po zarażeniu pod warunkiem, że nastąpiła serokonwersja przeciwciał przeciwko antygenom ES larw mięśniowych *T. britovi*.

Podsumowując, w pracy pt. „Insight into *Trichinella britovi* infection in pigs: effect of various infectious doses on larvae density and spatial larvae distribution in carcasses and comparison of the detection of anti-*T. britovi* IgG of three different commercial ELISA tests and immunoblot assay” wykazano, że dawki w zakresie 3000–5000 larw wyizolowanego w Polsce szczepu *T. britovi* są wystarczające do wywołania włośnicy u rodzimych ras świń o intensywności inwazji mogącej stanowić zagrożenie dla zdrowia publicznego i umożliwiającej rozprzestrzenianie się tego pasożyta w stadzie świń. Wyniki badań własnych potwierdziły również, że filary przepony stanowią predylekcyjne miejsce pobierania próbek podczas rutynowego badania świń na włośnicę. Strona tuszy, z której pobiera się mięśnie do badań nie wpływa natomiast na intensywność inwazji larw *T. britovi* i w przypadku badań epidemiologicznych lub ograniczonej dostępności próbek, aby uzyskać zadowalające wyniki w zakresie wykrywania zarażenia *Trichinella* oraz w celu określenia intensywności inwazji, próbkę do badań wystarczy pobrać z pojedynczego mięśnia lub grupy mięśni zlokalizowanych po stronie lewej lub prawej tuszy. W przypadku umiarkowanych dawek *T. britovi* stosowanych do zarażenia świń brak jest

wyraźnych współzależności pomiędzy dawką a intensywnością inwazji larw *T. britovi* w mięśniach, co sugeruje, że w pewnych zakresach wyższe dawki skuteczniej indukują lokalną odpowiedź immunologiczną, która prowadzi do redukcji liczby larw oraz postaci dorosłych w jelitach zarażonych osobników. U świń zarażonych umiarkowanymi dawkami *T. britovi*, swoiste przeciwciała przeciwko antygenom ES larw mięśniowych *T. britovi* pojawiają się w 36 dniu po zarażeniu, osiągają fazę plateau w dniu 45 i utrzymują się na stabilnym, wysokim poziomie przez 2 miesiące po zarażeniu. Czułość testów ELISA PrioCHECK<sup>®</sup> Trichinella Ab i Pigtype<sup>®</sup> Trichinella Ab była porównywalna, natomiast w przypadku testu ID Screen<sup>®</sup> Trichinella Indirect Multi-species była ona nieznacznie niższa zarówno w 36 jak również 41 dniu po zarażeniu. W przypadku uzyskania w teście ELISA wyników wątpliwych lub gdy wartości indeksu ELISA badanych surowic są zbliżone do poziomu linii odcięcia (90% wartości odcięcia lub powyżej), istnieje konieczność ponownego badania świń; uwzględniając aspekt ekonomiczny próbki surowic przeznaczone do kolejnej analizy mogą być pobrane od zwierząt w krótkim odstępie czasu, tj. po 2-5 dniach od uzyskania wyniku wątpliwego. Test Western blot oparty na antygenach ES larw mięśniowych *T. britovi* potwierdził wyniki testów ELISA, a surowicze przeciwciała anti-*Trichinella* IgG u świń zarażonych *T. britovi* wykazały reaktywność z antygenami *T. britovi* ML ES o masie cząsteczkowej 62, 55 i 52 kDa.

Praca 4.2.3. Gondek M., Knysz P., Pysz-Łukasik R., Łukomska A., Kuriga A., Pomorska-Mól M. (2021). Distribution of *Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi*, and *Trichinella pseudospiralis* in the diaphragms and *T. spiralis* and *T. britovi* in the tongues of experimentally infected pigs. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 696284.

Docelowym miejscem dla nowo narodzonych w jelicie larw (NBL) *Trichinella* spp. jest tkanka mięśniowa poprzecznie prążkowana, jednak ich dystrybucja w poszczególnych mięśniach zarażonego organizmu różni się istotnie. Największe zagęszczenie larw występuje w mięśniach bogato ukrwionych i wykazujących wysoką aktywność ruchową. Rozbudowany system krążenia w mięśniach mechanicznie sprzyja większemu napływowi do nich larw włośni, lecz inne mechanizmy molekularne zaangażowane w ich nierównomierne rozmieszczenie w poszczególnych mięśniach żywiciela nie zostały dotąd poznane. Mięśnie o największym zagęszczeniu larw *Trichinella* (największej intensywności inwazji) określone są w literaturze jako mięśnie predylekcyjne, a wybór mięśnia, pod względem jego anatomicznego umiejscowienia, do badania tusz zwierząt rzeźnych w kierunku włośnicy zależy wyłącznie od gatunku zwierzęcia. Gatunek *Trichinella* ma również wpływ na rozmieszczenie larw w poszczególnych mięśniach gospodarza, lecz na etapie rutynowego badania poubojowego inspektor nie może przewidzieć, który gatunek włośni odpowiedzialny jest za ewentualne zarażenie. Co więcej, czas, który upłynął od zarażenia do badania, a tym samym wzrost zwierzęcia i jego muskulatury, również odgrywa istotną rolę. Wzrost bowiem masy mięśniowej powoduje zmniejszenie intensywności

inwazji larw włośni (liczba larw/1 gram tkanki), a ponieważ kinetyka wzrostu poszczególnych mięśni jest różna, wzajemne proporcje poszczególnych mięśni w obciążeniu ich pasożytem (liczba larw/ 1 gram mięśnia) mogą również ulec zmianie w czasie trwania inwazji. Ponadto na dystrybucję larw wpływa również poziom intensywności inwazji włośni w mięśniach tusz zarażonych zwierząt.

Przeprowadzono liczne badania w celu zidentyfikowania mięśni predylekcyjnych u świń doświadczalnie zarażonych *Trichinella*, lecz *T. spiralis* był najczęściej wykorzystywanym gatunkiem włośnia w tych eksperymentach. Większość badaczy wykazała, że u świń zarażonych *T. spiralis*, przepona i język to mięśnie o najwyższej intensywności inwazji larw, niezależnie od dawki użytej do zarażenia, poziomu inwazji w całej tuszy, masy świni oraz czasu jaki upłynął od momentu zarażenia do uboju. Jednocześnie wykazywano również istotne różnice pomiędzy przeponą a językiem w zakresie wzajemnych proporcji w liczbie larw w 1 gramie tkanki. W badaniach przeprowadzonych przez Prosta i Nowakowskiego (1990), Korínkovą i wsp. (2008), Gondka i wsp. (2017) wykazano, że intensywność inwazji włośni w języku świń zarażonych niskimi dawkami *T. spiralis* wynosiła zaledwie 39-53% tej obserwowanej w przeponie. Z kolei w badaniach Kapela i wsp. (1998) oraz Forbes'a i Gajadhara (1999) intensywność inwazji *T. spiralis* w przeponie wynosiła 33-37% wartości obserwowanej w języku. Należy również podkreślić, że w dostępnej literaturze znaleźć można znacznie mniej informacji na temat dystrybucji larw innych niż *T. spiralis* gatunków włośni w mięśniach zarażonych świń. Podobnie niewiele jest danych dotyczących rozmieszczenia larw różnych gatunków włośni w poszczególnych częściach anatomicznych przepony u zarażonych świń. Tylko dwa doświadczenia przeprowadzone przez Kotulę i wsp. (1984) oraz Serrano i wsp. (1999) dostarczyły wiedzy w tym zakresie, lecz w obydwu tych eksperymentach wykorzystano świnię zarażoną tylko *T. spiralis* lub *T. spiralis* /*T. britovi* bez podziału jednak zwierząt na grupy zarażone poszczególnymi gatunkami włośni.

Jak już wspomniano, zgodnie z Rozporządzeniem Wykonawczym Komisji (UE) 2015/1375 z dnia 10 sierpnia 2015 r. referencyjną metodą stosowaną do badania mięsa świń oraz innych gatunków zwierząt rzeźnych i dzików w kierunku włośni jest metoda wytrawiania próby zbiorczej z zastosowaniem magnetycznego mieszania. Technika ta pozwala na badanie próbek jednostkowych, a także próby zbiorczej o masie 100 g. Pierwotne zapisy tego Rozporządzenia zakładały, że w przypadku świń do próby zbiorczej, próbkę o masie 1 g (tuczniaki) lub 2 g (maciory i knury hodowlane) należy pobrać z filarów przepony, a w przypadku ich braku z części żebrowej lub mostkowej przepony, języka, mięśni żuchwowych lub mięśni brzucha jednak o masie dwukrotnie większej. W roku 2020 Rozporządzenie Wykonawcze Komisji (UE) 2020/1478 zmieniło Rozporządzenie 2015/1375, wprowadzając normę ISO, w której opisano referencyjną metodę badania mięsa na włośnię oraz określono nowe zasady pobierania próbek do badań. Zgodnie z tym dokumentem, z tusz świń, do badań w próbie zbiorczej, próbkę należy pobrać z filarów przepony lub mięśni żwaczy, a w przypadku ich braku, z innych, nieokreślonych w normie, mięśni zastępczych. Masa próbki powinna natomiast być ustalona na podstawie analizy ryzyka wystąpienia włośnicy u badanych zwierząt, wiedzy odnośnie czułości metody oraz celu badania. W przypadku jednak mięśni predylekcyjnych u świń masa ta nie

może być mniejsza niż 1 gram; w przypadku zaś mięśni zastępczych, masy próbek pobieranych do badań nie określono. Krajowe Laboratorium Referencyjne zaleca jednak, aby próbki od świń do badań na włośnię referencyjną metodą wytrawiania próby zbiorczej pobierać zgodnie z wcześniej obowiązującym schematem, tj., z filarów przepony (tuczniaki - 1 g; maciory i knury - 2 g), a w przypadku ich braku z mięśni zastępczych: części żebrowej lub mostkowej przepony (tuczniaki - 2 g; maciory i knury - 4 g), języka (tuczniaki - 2 g; maciory i knury - 4 g), mięśni zuchwowych (tuczniaki - 2 g; maciory i knury - 4 g), lub mięśni brzucha (tuczniaki - 2 g; maciory i knury - 4 g).

W przeprowadzonym doświadczeniu, którego wyniki opublikowano w **pracy 4.2.3** dokonano oceny rozmieszczenia larw mięśniowych *T. spiralis*, *T. britovi* i *T. pseudospiralis* w trzech różnych częściach anatomicznych (filarach, części żebrowej i części mostkowej) przepony z uwzględnieniem strony lewej i prawej u świń doświadczalnie zarażonych dawką 300 *T. spiralis* (n=10), 5000 *T. britovi* (n=8) i 800 *T. pseudospiralis* (n=9). W konstrukcji modelu statystycznego wykorzystano dwie różne zmienne: (1) gatunek *Trichinella* użyty do zarażenia zwierząt oraz (2) poziom intensywności inwazji larw *Trichinella* spp. w całej przeponie zarażonych świń. Ponadto zbadano dystrybucję otorbionych gatunków włośni (tj. *T. spiralis* i *T. britovi*) w trzech różnych częściach anatomicznych języka (wierzchołek, trzon i korzeń) zarażonych świń. Intensywność inwazji w analizowanych mięśniach wyznaczono stosując referencyjną metodę wytrawiania tkanki mięśniowej opisaną w normie ISO 18743:2015.

Wyniki badań własnych wykazały brak statystycznie istotnych różnic w intensywności inwazji *Trichinella* spp. pomiędzy trzema różnymi częściami przepony, tj. filarami, częścią żebrową i częścią mostkową ( $P > 0.05$ ) w grupach świń zarażonych *T. spiralis*, *T. britovi* oraz *T. pseudospiralis*. Wyniki badań indywidualnych świń wykazały natomiast, że spośród 27 zwierząt zarażonych trzema różnymi genotypami *Trichinella*, u 23 osobników (85.19%) filary przepony charakteryzowały się najwyższą intensywnością inwazji. Analizując poszczególne grupy doświadczalne wykazano, że intensywność inwazji larw mięśniowych włośni była najwyższa w filarach przepony u 9 z 10 (90%) świń zarażonych *T. spiralis*, 5 z 8 (62.5%) świń zarażonych *T. britovi* oraz u wszystkich dziewięciu świń (100%) zarażonych *T. pseudospiralis*. Ponadto u pozostałych czterech świń, u których największe nasilenie inwazji larw mięśniowych *Trichinella* obserwowano w częściach przepony innych niż filary, intensywność inwazji włośni w filarach, w ujęciu procentowym, była nie mniejsza niż 70% tej obserwowanej w części przepony o największej liczbie larw w 1 gramie badanej tkanki. Powszechnie wiadomo, że wraz ze wzrostem zwierzęcia wzajemne proporcje masowe poszczególnych mięśni względem innych mięśni lub poszczególnych części danego mięśnia w stosunku do innych części tego samego mięśnia ulegają zmianie. Zjawisko to może powodować „rozrzedzenie” liczby larw w 1 gramie tkanki mięśniowej, a tym samym wpływać na wzajemne proporcje intensywności inwazji włośni pomiędzy różnymi mięśniami lub różnymi częściami tego samego mięśnia, zwłaszcza jeśli kinetyka ich wzrostu różni się istotnie. W tym zakresie wyniki badań własnych nie dostarczyły jednak istotnych dowodów na to, że różnice w całkowitej masie przepony świń, w zakresie 55.80–167.25 g, wpływają na

intensywność inwazji larw włośni, ponieważ średni procentowy stosunek masy poszczególnych części przepony do całkowitej jej masy u wszystkich świń zarażonych doświadczalnie był stały i wynosił dla części łędźwiowej, żebrowej i mostkowej odpowiednio 41.82% ( $\pm 4.61$ ), 45.44% ( $\pm 4.50$ ) i 12.74% ( $\pm 1.05$ ) w stosunku do całkowitej masy tego mięśnia. Wyniki badań własnych wykazały również, że w przypadku świń zarażonych otorbionymi gatunkami *Trichinella* (*T. spiralis* i *T. britovi*) stwierdzono dodatnią korelację w liczbie larw/1 gram tkanki pomiędzy wszystkimi trzema częściami przepony, natomiast w przypadku świń zarażonych *T. pseudospiralis* takie statystyczne zależności wykazano tylko pomiędzy filarami i częścią żebrową oraz pomiędzy filarami i częścią mostkową przepony. Może to wskazywać na nieco inny mechanizm migracji otorbionych i nieotorbionych gatunków *Trichinella* do poszczególnych części anatomicznych przepony u zarażonych świń.

Pomimo, że masa indywidualnych świń użytych w doświadczeniu, zarówno podczas zarażenia jak i uboju była wyrównana, w badaniach własnych zaobserwowano duże zróżnicowanie w intensywności inwazji włośni pomiędzy poszczególnymi osobnikami w poszczególnych grupach doświadczalnych; w szczególności zaś różnice te uwidoczniły się w grupie świń zarażonych *T. pseudospiralis* (zakres: 0.01–65.61 larw *T. pseudospiralis*/1 gram tkanki mięśniowej przepony). W konsekwencji wpłynęły one istotnie na wyniki analizy statystycznej przeprowadzonej z wykorzystaniem testów parametrycznych jak i nieparametrycznych. Przeprowadzone badania wykazały jednak, że u świń, u których filary przepony charakteryzowały się najwyższą intensywnością inwazji larw włośni, średnia intensywność inwazji larw w ujęciu procentowym, w części żebrowej wynosiła 76.31%, a w części mostkowej 75.10% tej obserwowanej w filarach przepony. Biorąc jednak pod uwagę, że minimalne wartości wynosiły odpowiednio 44.45 i 40.68% dla części żebrowej i mostkowej przepony w stosunku do części łędźwiowej, jest całkowicie uzasadnione, aby w przypadku badania świń metodą wytrawiania próby zbiorczej, masa próbek pobieranych z części mostkowej lub żebrowej przepony była zwiększona co najmniej dwukrotnie w stosunku do masy próbek pobieranych z filarów przepony. Jest to szczególnie istotne, gdy świnię są badane zbiorczo w maksymalnej liczbie (25, 50 lub 100), a każda świnią jest reprezentowana przez masę próbki wynoszącą 1 (filary przepony od tuczników), 2 (część żebrowa lub mostkowa od tuczników lub filary przepony od macior lub knurów) lub 4 (część żebrowa lub mostkowa od macior lub knurów) gramy. Teoretyczna czułość metody wytrawiania wynosi 1 larwa na 1 gram tkanki; jednak jak wykazali Prost i Nowakowski (1990) przy tym poziomie intensywności inwazji *T. spiralis* w przeponie zarażonych świń i przy użyciu 1 gramowych próbek, rzeczywista czułość metody wynosi 73%. Wzrasta ona do 90 lub 100%, jeśli badaniu podlegają próbki o masach odpowiednio 2 i 3 gramy. Podobnie Forbes i Gajadhar (1999) wykazali, że w celu niezawodnego wykrycia wywołanej *T. spiralis* włośnicy o intensywności inwazji 1.0–1.9 larw/gram tkanki mięśniowej, masa badanych próbek powinna wynosić 3–5 g. Dlatego też, aby w pełni zrozumieć współzależność w zagęszczeniu larw poszczególnych gatunków *Trichinella* pomiędzy filarami a pozostałymi dwoma częściami przepony oraz określić minimalną masę próbki pobieranej z części mostkowej i żebrowej przepony do rutynowego badania świń metodą wytrawiania próby zbiorczej, konieczne są dalsze



badania z wykorzystaniem świń, u których intensywność inwazji larw mięśniowych *T. britovi* i *T. pseudospiralis* w filarach przepony wynosiłaby 1 larwa/1 gram tkanki.

Wyniki badań własnych wykazały również, że dystrybucja larw mięśniowych *Trichinella* spp. w poszczególnych częściach anatomicznych przepony może częściowo zależeć od intensywności inwazji larw w całej przeponie. W grupie świń bowiem o umiarkowanej (21–35 larw *Trichinella* spp./ 1g tkanki mięśniowej) lub umiarkowanie wysokiej (35–55 larw *Trichinella* spp./ 1g tkanki mięśniowej) intensywności inwazji *Trichinella* spp. w całym mięśniu, gęstość larw w filarach była statystycznie istotnie wyższa ( $P < 0.05$ ) niż w części żebrowej lub mostkowej przepony. Nie zaobserwowano natomiast takich różnic w grupach świń wykazujących niski (4–12 larw *Trichinella* spp./ 1g tkanki mięśniowej), umiarkowanie niski (12–21 larw *Trichinella* spp./ 1g tkanki mięśniowej) lub wysoki (>60 larw *Trichinella* spp./ 1g tkanki mięśniowej) poziom inwazji *Trichinella* spp. w całej przeponie. Zjawisko to jest trudne do wyjaśnienia, jednak może być ono efektem zmian w hemodynamice przepływu krwi w przeponie w odpowiedzi na różną liczbę penetrujących larw.

W badaniach własnych nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic ( $P > 0.05$ ) w intensywności inwazji larw mięśniowych *Trichinella* spp. pomiędzy lewą i prawą stroną całej przepony oraz poszczególnych jej części u świń zarażonych *T. spiralis*, *T. britovi* oraz *T. pseudospiralis*, jak również u świń prezentujących różny poziom inwazji larw w przeponie. Może to mieć szczególne znaczenie w badaniach epidemiologicznych oraz eksperymentalnych. W doświadczeniach bowiem, w których określenie intensywności inwazji w przeponie zarażonych świń jest procedurą dodatkową, a nie głównym ich celem lub w badaniach, w których dostępność próbek jest ograniczona, próbkę wystarczy pobrać z jednej tylko strony poszczególnej części przepony, aby uzyskać wiarygodne wyniki w krótkim czasie.

W kolejnej części badań, których wyniki opublikowano w **pracy 4.2.3** wykazano homogenne rozmieszczenie larw *T. spiralis* i *T. britovi* w trzech różnych częściach anatomicznych języka; nie stwierdzono bowiem statystycznie istotnych różnic w intensywności inwazji włośni pomiędzy wierzchołkiem, trzonem i nasadą języka u świń zarażonych *T. spiralis* ( $P > 0.05$ ) oraz *T. britovi* ( $P > 0.05$ ). Spośród łącznie 18 świń zarażonych *T. spiralis* i *T. britovi*, u pięciu osobników (27.78%) wierzchołek języka wykazywał najwyższą intensywność inwazji larw *Trichinella*. Trzon języka charakteryzował się najwyższą gęstością larw przypadającą na 1 gram tkanki u 9 (50%) osobników. Z kolei u pozostałych 4 świń (22.22%) najwyższą intensywność inwazji włośni stwierdzono w korzeniu języka. Ponadto w grupie świń zarażonych zarówno *T. spiralis* jak i *T. britovi* wykazano statystycznie istotną ( $P < 0.05$ ), dodatnią korelację pomiędzy intensywnością inwazji włośni w trzonie języka a intensywnością inwazji w korzeniu języka ( $R = 0.830$  i  $R = 0.942$  dla świń zarażonych odpowiednio *T. spiralis* i *T. britovi*). Badania własne wykazały również, że średnia intensywność inwazji larw włośni stanowiła w wierzchołku, trzonie oraz korzeniu języka odpowiednio 51.64% (zakres: 8.99–116.13%), 63.97% (zakres: 28.64–106.89%) oraz 56.18% (zakres: 11.53–101.75%) intensywności inwazji obserwowanej w filarach przepony. Na szczególną jednak uwagę zasługują wartości minimalne, które

wykazały, że u niektórych zarażonych osobników intensywność inwazji *Trichinella* spp. w języku była nawet 10-krotnie niższa w porównaniu do części lędźwiowej przepony. Wynik ten może sugerować, że próbka o masie 2 gramów pobrana zwłaszcza z wierzchołka lub korzenia języka nie powinna być traktowana jako ekwiwalent próbki 1-gramowej pobranej z filarów przepony podczas rutynowego badania świń w kierunku *Trichinella* spp. z zastosowaniem metody wytrawiania próby zbiorczej.

W ostatniej części badań wykazano, że nasilenie reakcji zapalnej w mięśniu przepony różniło się pomiędzy grupami zarażonych świń. Próbki przepon pobrane od świń zarażonych *T. spiralis* i *T. britovi* wykazywały obfity lub umiarkowany naciek zapalny. W przypadku inwazji wywołanej *T. spiralis*, rozlany naciek zapalny w przylegającej tkance śródmiąższowej obserwowany był znacznie częściej w porównaniu do zmian indukowanych przez *T. britovi*. Tkanka mięśniowa świń zarażonych *T. pseudospiralis* wykazywała z kolei cechy ogniskowego i rozlanego zapalenia o różnym nasileniu; jednak w większości próbek reakcja zapalna była mniej intensywna niż ta wywołana przez *T. spiralis* i *T. britovi*. Obserwacje te potwierdziły, że *T. pseudospiralis* charakteryzuje się niższą patogennością dla świń w porównaniu do *T. spiralis* i *T. britovi*, co jest również zgodne z wynikami innych badań prowadzonych głównie na modelu mysim, w których stosowane były klasyczne metody histologiczne, immunohistochemiczne oraz immunoblotting.

Podsumowując, w artykule pt. „Distribution of *Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi*, and *Trichinella pseudospiralis* in the diaphragms and *T. spiralis* and *T. britovi* in the tongues of experimentally infected pigs” dokonano pierwszej na świecie oceny rozmieszczenia larw trzech różnych gatunków włośni (*T. spiralis*, *T. britovi* i *T. pseudospiralis*) należących do dwóch różnych kładów (otorbionego i nieotorbionego) w trzech różnych częściach anatomicznych przepony (filary, część żebrowa i część mostkowa) zarażonych świń, z uwzględnieniem lewej i prawej strony mięśnia. Doświadczenie to potwierdziło, że w przypadku urzędowego badania tusz wieprzowych przy użyciu metody wytrawiania próby zbiorczej (w której każda świnia reprezentowana jest przez próbkę 1 gramową) próbki powinny być pobierane z filarów przepony, jeśli zaś filary przepony nie są dostępne próbki pobrane z pozostałych części przepony (tj. żebrowej lub mostkowej) powinny mieć masę co najmniej dwukrotnie większą. Niewątpliwie jednak, aby w pełni zrozumieć współzależność w zagęszczeniu larw poszczególnych gatunków *Trichinella* pomiędzy filarami a pozostałymi dwoma częściami przepony oraz określić minimalną masę próbki pobieranej z części mostkowej i żebrowej do rutynowego badania świń metodą wytrawiania próby zbiorczej, konieczne są dalsze badania z wykorzystaniem świń, u których intensywność inwazji larw mięśniowych *T. britovi* i *T. pseudospiralis* w filarach przepony byłaby na poziomie limitu detekcji referencyjnej metody wytrawiania (1 larwa/1 gram tkanki). Niezależnie od gatunku włośni wywołującego zarażenie, jak również poziomu inwazji larwy włośni wykazywały homogenną dystrybucję po obydwu stronach (lewa i prawa) całej przepony i poszczególnych jej części. W związku z tym w przypadku badań epidemiologicznych lub doświadczeń, w których określenie intensywności inwazji w przeponie zarażonych świń jest procedurą dodatkową, a nie głównym ich celem lub w badaniach, w których dostępność próbek jest ograniczona,

próbkę wystarczy pobrać z jednej tylko strony poszczególnej części przepony, aby uzyskać wiarygodne wyniki w krótkim czasie. Wykazano ponadto, że larwy mięśniowe zarówno *T. spiralis* jak i *T. britovi* wykazywały jednorodną dystrybucję we wszystkich trzech częściach języka; jednak wyniki badań indywidualnych świń doświadczalnie zarażonych *T. spiralis* i *T. britovi* sugerują, że próbka pobrana z korzenia lub wierzchołka języka o dwukrotnie większej masie w porównaniu do filarów przepony może nie odpowiadać próbce pobranej z filarów przepony pod względem wykrywania włośnicy wywoływanej przez otorbione gatunki *Trichinella* u świń. Zarażenie świń *T. spiralis* oraz *T. britovi* indukuje w mięśniach stan zapalny o większym nasileniu w porównaniu do nieotorbionego się gatunku *T. pseudospiralis*.

#### 4.3.2. Podsumowanie:

Przedstawione w cyklu publikacyjnym wyniki pogłębiają i dostarczają nowej wiedzy na temat wpływu zarażenia rodzimych ras hodowanych w Polsce świń trzema różnymi gatunkami włośnicy (tj. *T. spiralis*, *T. britovi*, *T. pseudospiralis*) na zmiany w surowiczym ich proteomie, odpowiedź immunologiczną oraz dystrybucję larw *Trichinella* spp. w mięśniach. Zaprezentowane wyniki mają znaczenie w zakresie nauk podstawowych poprzez zbadanie przebiegu humoralnej odpowiedzi immunologicznej i odpowiedzi ostrej fazy w różnych dniach inwazji wywołanej różnymi gatunkami *Trichinella* oraz określenie zmian ekspresji białek w surowicy świń w dwóch różnych fazach zarażenia: wczesnej-jelitowej oraz późnej-mięśniowej. Przedstawione wyniki mają także zastosowanie praktyczne poprzez ocenę przydatności różnych testów serologicznych do wykrywania włośnicy świń oraz określenie dystrybucji larw włośnicy w mięśniach zarażonych zwierząt; mogą one również stanowić źródło wiedzy dla inspektorów weterynaryjnych oraz urzędowych lekarzy weterynarii wykonujących badanie świń w kierunku włośnicy oraz wszelkich instytucji zajmujących się tworzeniem i ulepszaniem prawodawstwa żywnościowego.

Na podstawie przeprowadzonych badań można zatem sformułować następujące szczegółowe stwierdzenia i wnioski:

1. Zarażenie *T. spiralis*, *T. britovi* i *T. pseudospiralis* indukuje zmiany w profilu proteomicznym surowicy świń. Przebieg tych zmian zależy od gatunku *Trichinella* wywołującego inwazję oraz od fazy zarażenia.
2. W przypadku świń doświadczalnie zarażonych otorbionymi gatunkami *Trichinella*, zmiany w relatywnej ekspresji białek surowicy (wzrost/spadek) w 60 dniu po zarażeniu charakteryzują się większym nasileniem w porównaniu do dnia 13 po zarażeniu. Zjawisko to wskazuje na progresję choroby i sugeruje, że pozajelitowa faza inwazji, charakteryzująca się obecnością w pełni uformowanych i otorbionych larw włośnicy w mięśniach prądkowanych żywiciela, indukuje znacznie silniejsze zmiany w proteomie surowicy zarażonych świń.

3. Zarażenie *Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi* i *Trichinella pseudospiralis* powoduje zaburzenia metabolizmu lipidów objawiające się obniżeniem ekspresji Apo A-I, Apo E lub Apo J w surowicy zarażonych świń we wczesnej lub późnej fazie inwazji.
4. W zależności od gatunku *Trichinella* wywołującego inwazję, zmiany surowiczej ekspresji białek dotyczą również białek uczestniczących w odpowiedzi immunologicznej, reakcji zapalnej, procesie krzepnięcia krwi, produkcji kolagenu i różnicowaniu komórek mięśniowych.
5. Pomiar surowiczego stężenia pozytywnych białek ostrej fazy takich jak CRP, Hp, Pig-MAP i SAA nie może być wykorzystywany jako przesiewowe narzędzie do przyżyciowego monitorowania zarażeń świń umiarkowanymi dawkami *T. spiralis*, *T. britovi* oraz *T. pseudospiralis*.
6. Ocena poziomu przeciwciał IgM przeciwko antygenom ES larw mięśniowych *Trichinella* ma ograniczoną wartość diagnostyczną u świń zarażonych *Trichinella* spp. Ich wzrost nie został udowodniony we wczesnej, jelitowej fazie inwazji, w związku z czym pomiar anty-*Trichinella* IgM nie powinien być traktowany jako rutynowe narzędzie diagnostyczne uzupełniające procedurę wykrywania trichinellozy opartą na pomiarze przeciwciał anty-*Trichinella* IgG u świń.
7. W surowicy świń zarażonych umiarkowanymi dawkami *T. spiralis*, *T. britovi* lub *T. pseudospiralis* specyficzne przeciwciała IgG przeciwko antygenom ES larw mięśniowych *Trichinella* wykrywane są w 30 – 36 dniu po ich zarażeniu. Wyniki te znajdują potwierdzenie w literaturze i są typowe dla umiarkowanych dawek stosowanych do zarażenia świń w warunkach doświadczalnych.
8. Zastosowanie antygenu ES pozyskanego z larw włośni tego samego gatunku, którym zarażone są świnię (antygen homologiczny) może przyczynić się do podwyższenia czułości testu ELISA w zakresie wykrywania włośnicy u tych zwierząt.
9. Różnice w kinetyce produkcji przeciwciał anty-*Trichinella* IgG pomiędzy świnią zarażonymi otorbionymi gatunkami włośni i świnią zarażonymi *T. pseudospiralis* związane są prawdopodobnie z cechami charakterystycznymi dla danego gatunku włośni takimi jak czas potrzebny do zakończenia wzrostu larw w mięśniach gospodarza i wytworzenia przez nie w pełni funkcjonalnych stichosomów, a w konsekwencji różnicami w ilości i strukturze produktów ES uwalnianych przez larwy do krwiobiegu żywiciela w poszczególnych dniach po zarażeniu.
10. Dawki w zakresie 3000–5000 larw wyizolowanego w Polsce szczepu *T. britovi* są wystarczające do wywołania włośnicy u rodzimych ras świń o intensywności inwazji mogącej stanowić zagrożenie dla zdrowia publicznego i umożliwiającą rozprzestrzenianie się tego pasożyta w stadzie świń.
11. Strona tuszy, z której pobiera się mięśnie do badań nie wpływa na intensywność inwazji larw *T. britovi* i w przypadku badań epidemiologicznych lub ograniczonej dostępności próbek, aby

uzyskać zadowalające wyniki w zakresie wykrywania zarażenia *Trichinella* oraz określenia intensywności inwazji, próbkę do badań wystarczy pobrać z pojedynczego mięśnia lub grupy mięśni zlokalizowanych po stronie lewej lub prawej tuszy.

12. W przypadku umiarkowanych dawek *T. britovi* stosowanych do zarażenia świń, brak jest wyraźnych współzależności między dawką a intensywnością inwazji larw *T. britovi* w mięśniach, co sugeruje, że w pewnych zakresach wyższe dawki skuteczniej indukują lokalną odpowiedź immunologiczną, która prowadzi do redukcji liczby larw oraz postaci dorosłych w jelitach zarażonych osobników.
13. W surowicy świń zarażonych umiarkowanymi dawkami *T. britovi* swoiste przeciwciała przeciwko antygenom ES larw mięśniowych *T. britovi* pojawiają się w dniu 36 po zarażeniu, osiągają fazę plateau w dniu 45 i utrzymują się na stabilnym, wysokim poziomie przez 2 miesiące po zarażeniu.
14. Komercyjne zestawy ELISA PrioCHECK<sup>®</sup> Trichinella Ab, Pigtype<sup>®</sup> Trichinella Ab oraz ID Screen<sup>®</sup> Trichinella Indirect Multi-species nadają się do wykrywania włośnicy świń wywołanej *T. britovi*. Czulość testów ELISA PrioCHECK<sup>®</sup> Trichinella Ab i Pigtype<sup>®</sup> Trichinella Ab była porównywalna, natomiast w przypadku testu ID Screen<sup>®</sup> Trichinella Indirect Multi-species była ona nieznacznie niższa zarówno w 36 jak również 41 dniu po zarażeniu.
15. W przypadku uzyskania w komercyjnym teście ELISA wyników wątpliwych lub gdy wartości indeksu ELISA badanych surowic są zbliżone do poziomu linii odcięcia (90% wartości punktu odcięcia lub powyżej), istnieje konieczność ponownego badania świń, a próbki surowic do kolejnej analizy mogą być pobrane od zwierząt w krótkim odstępie czasu, tj. po 2-5 dniach od uzyskania wyniku wątpliwego.
16. Test Western blot oparty na antygenach ES larw mięśniowych *T. britovi* może być stosowany do potwierdzenia wyników testu ELISA, a surowice świń zarażonych *T. britovi* wykazują reaktywność z antygenami *T. britovi* ML ES o masie cząsteczkowej 62, 55 i 52 kDa.
17. W przypadku urzędowego badania tusz wieprzowych przy użyciu metody wytrawiania próby zbiorczej próbki powinny być pobierane z filarów przepony, jeśli zaś filary przepony są niedostępne, próbki pobrane z pozostałych części przepony (tj. żebrowej lub mostkowej) powinny mieć masę co najmniej dwukrotnie większą.
18. Niezależnie od gatunku włośnia wywołującego zarażenie jak również poziomu inwazji, larwy włośni wykazują homogeną dystrybucję po obydwu stronach (lewa i prawa) całej przepony i poszczególnych jej części. Do badań epidemiologicznych lub doświadczeń, w których określenie intensywności inwazji w przeponie zarażonych świń jest procedurą dodatkową, a nie głównym ich celem, lub w badaniach, w których dostępność próbek jest ograniczona, próbkę wystarczy pobrać z jednej tylko strony poszczególnych części przepony, aby uzyskać wiarygodne wyniki w krótkim czasie.

19. Larwy mięśniowe zarówno *T. spiralis*, jak i *T. britovi* wykazują jednorodną dystrybucję we wszystkich trzech częściach języka; jednak wyniki badań indywidualnych świń doświadczalnie zarażonych *T. spiralis* i *T. britovi* sugerują, że próbka pobrana z korzenia lub wierzchołka języka o dwukrotnie większej masie (2 g) w porównaniu do filarów przepony może nie odpowiadać próbce pobranej z filarów przepony (1 g) pod względem wykrywania włośnicy wywoływanej przez otorbione gatunki *Trichinella* u świń i do próby zbiorczej powinna być ona zwiększona.
20. Zarażenie świń *T. spiralis* oraz *T. britovi* indukuje w ich mięśniach stan zapalny o większym nasileniu w porównaniu do nieotrabiającego się gatunku *T. pseudospiralis*.

#### 4.3.3. Piśmiennictwo:

1. Akkoc N., Kuruuzum Z., Akar S., Yuce A., Onen F., Yapar N., Ozgenc O., Turk M., Ozdemir D., Avci M., Guruz Y., Oral A.M., Pozio E., Izmir Trichinellosis Outbreak Study Group, 2009: A large-scale outbreak of trichinellosis caused by *Trichinella britovi* in Turkey. *Zoonoses Public Health* 56, 65-70.
2. Anderson D.M., Arredondo J., Hahn K., Valente G., Martin J.F., Wilson-Rawls J., Rawls A. 2006: Mohawk is a novel homeobox gene expressed in the developing mouse embryo. *Dev. Dyn.* 235, 792–801.
3. Anderson D.M., Beres B.J., Wilson-Rawls J., Rawls A 2009: The homeobox gene Mohawk represses transcription by recruiting the sin3A/HDAC co-repressor complex. *Dev. Dyn.* 238, 572–580.
4. Baralla A., Sotgiu E., Deiana M., Pasella S., Pinna S., Mannu A., Canu E., Sotgiu G., Ganau A., Zinellu A., Sotgia S., Carru C., Deiana L. 2015: Plasma clusterin and lipid profile: A link with aging and cardiovascular diseases in a population with a consistent number of centenarians. *PLoS ONE* 10, e0128029.
5. Beck R., Beck A., Lucinger S., Florijancić T., Bosković I., Marinculić A. 2009: *Trichinella pseudospiralis* in pig from Croatia. *Vet. Parasitol.* 159, 304–307.
6. Behrens N.E., Lipke P.N., Pilling D., Gomer R.H., Klotz S.A. 2019: Serum Amyloid P Component binds fungal surface amyloid and decreases human macrophage phagocytosis and secretion of inflammatory cytokines. *MBio* 10, e00218-19.
7. Bień J., Cabaj W., Moskwa B. 2015: Proteomic analysis of potential immunoreactive proteins from muscle larvae and adult worms of *Trichinella spiralis* in experimentally infected pigs. *Folia Parasitol.* 62, 022.
8. Bień J., Näreaho A., Varmanen P., Goździk K., Moskwa B., Cabaj W., Nyman T.A., Savijoki K. 2012: Comparative analysis of excretory-secretory antigens of *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi* muscle larvae by two-dimensional difference gel electrophoresis and immunoblotting. *Proteome Sci.* 10, 10.

9. Bilska-Zajac E., Różycki M., Chmurzyńska E., Marucci G., Cencek T., Karamon J., Bocian Ł., 2013: *Trichinella* species circulating in wild boars (*Sus scrofa*) populations in Poland. *Int. J. Parasitol. Parasites Wild.* 2, 211-213.
10. Bilska-Zajac E., Różycki M., Grądział-Krukowska K., Bełcik A., Mizak I., Karamon J., Sroka J., Zdybel J., Cencek T. 2020: Diversity of *Trichinella* species in relation to the host species and geographical location. *Vet. Parasitol.* 279, 109052.
11. Bilska-Zajac E., Różycki M., Karamon J., Sroka J., Cencek T. 2019: The role of epidemiological investigations in the current epidemiology of trichinellosis in Poland. *Życie Wet.* 94, 435-440.
12. Bilska-Zajac E., Różycki M., Korpysa-Dzirba W., Bełcik A., Ziętek-Barszcz A., Włodarczyk-Ramus M., Gontarczyk A., Cencek T. 2021: *Trichinella* outbreaks on pig farms in Poland in 2012–2020. *Pathogens*, 10(11), 1504.
13. Boonmars T., Wu Z., Nagano I., Takahashi Y. 2004: Expression of apoptosis-related factors in muscles infected with *Trichinella spiralis*. *Parasitology* 128, 323–332.
14. Boonmars T., Wu Z., Nagano I., Takahashi Y. 2005: What is the role of p53 during the cyst formation of *Trichinella spiralis*? A comparable study between knockout mice and wild type mice. *Parasitology* 131, 705–712.
15. Bradwell A.R. 2005: Serum free light chain measurements move to center stage. *Clin. Chem.* 51, 805–807.
16. Braesch-Andersen S., Paulie S., Smedman C., Mia S., Kumagai-Braesch M. 2013: ApoE production in human monocytes and its regulation by inflammatory cytokines. *PLoS ONE* 8, e79908.
17. Brand K., Mackman N., Curtiss L.K. 1993: Interferon-gamma inhibits macrophage apolipoprotein E production by posttranslational mechanisms. *J. Clin. Investig.* 91, 2031–2039.
18. Bruschi F., Marucci G., Pozio E., Masetti M. 2009: Evaluation of inflammatory responses against muscle larvae of different *Trichinella* species by an image analysis system. *Vet. Parasitol.* 159, 258–262.
19. Buquicchio R., Foti C., Loconsole F., Polimeno L., Ventura M.T. 2017: Clusterin serum level: How does it affect psoriatic patients? *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 31, 785–789.
20. Carpintero R., Piñeiro M., Andrés M., Iturralde M., Alava M.A., Heegaard P.M., Jobert J.L., Madec F., Lampreave F. 2005: The concentration of apolipoprotein A-I decreases during experimentally induced acute-phase processes in pigs. *Infect. Immun.* 73, 3184–3187.
21. Clausen M.R., Meyer C.N., Krantz T., Moser C., Gomme G., Kayser L., Albrechtsen J., Kapel C.M.O., Bagbjerg I.C. 1996: *Trichinella* infection and clinical disease. *Q. J. Med.* 89, 631–636.
22. Chuang H.N., Hsiao K.M., Chang H.Y., Wu C.C., Pan H. 2014: The homeobox transcription factor *Irx11* negatively regulates *MyoD* expression and myoblast differentiation. *FEBS J.* 281, 2990–3003.

23. Cui J., Liu R.D., Wang L., Zhang X., Jiang P., Liu M.Y., Wang Z.Q. 2013: Proteomic analysis of surface proteins of *Trichinella spiralis* muscle larvae by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Parasit. Vectors* 6, 355.
24. Cui J., Liu R.D., Wang L., Zhang X., Jiang P., Liu M.Y., Wang Z.Q. 2013: Proteomic analysis of surface proteins of *Trichinella spiralis* muscle larvae by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Parasit. Vectors* 6, 355.
25. Dalcin D., Zarlenga D.S., Larter N.C., Hoberg E., Boucher D.A., Merrifield S., Lau R., Ralevski F., Cheema K., Schwartz K.L., Boggild A.K. 2017: *Trichinella nativa* outbreak with rare thrombotic complications associated with meat from a black bear hunted in Northern Ontario. *Clin. Infect. Dis.* 64, 1367–1373.
26. Derda M., Boczoń K., Wandurska-Nowak E., Wojt W. 2003: Changes in the activity of glutathione-S-transferase in muscles and sera from mice infected with *Trichinella spiralis* after treatment with albendazole and levamisole. *Parasitol. Res.* 89, 509–512.
27. Derda M., Wandurska-Nowak E., Hadaś E. 2004: Changes in the level of antioxidants in the blood from mice infected with *Trichinella spiralis*. *Parasitol. Res.* 93, 207–210.
28. Despommier D.D. 1993: *Trichinella spiralis* and concept of niche. *J. Parasitol.* 79(4), 472 – 482.
29. EN ISO 18743: 2015. Microbiology of the food chain — Detection of *Trichinella* larvae in meat by artificial digestion method.
30. Epand R.M., Stafford A., Leon B., Lock P.E., Tytler E.M., Segrest J.P., Anantharamaiah G.M. 1994: HDL and apolipoprotein A-I protect erythrocytes against the generation of procoagulant activity. *Arterioscler. Thromb.* 14, 1775–1783.
31. Espiritu D.J., Mazzone T. 2008: Oxidative stress regulates adipocyte apolipoprotein e and suppresses its expression in obesity. *Diabetes* 57, 2992–2998.
32. Evans R.W., Pattern B.M. 1982: Trichinosis associated with superior sagittal sinus thrombosis. *Ann. Neurol.* 11, 216–217.
33. Farid A.S., Fath E.M., Mido S., Nonaka N., Horii Y. 2017: Paraoxonase-1 activity is related to *Trichinella spiralis*-induced hepatitis in rats. *Eur. J. Clin. Investig.* 47, 250–261.
34. Fernandez J.A., Deguchi H., Banka C.L., Witztum J.L., Griffin J.H. 2015: Re-evaluation of the anticoagulant properties of high-density lipoprotein-brief report. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35, 570–572.
35. Forbes L.B., Gajadhar A.A. 1999: A validated *Trichinella* digestion assay and an associated sampling and quality assurance system for use in testing pork and horse meat. *J. Food. Prot.* 62, 1308–1313.
36. Gabrashanska M., Teodorova S.E., Petkova S., Mihov L., Anisimova M., Ivanov D. 2010: Selenium supplementation at low doses contributes to the antioxidant status in *Trichinella spiralis*-infected rats. *Parasitol. Res.* 106, 561–570.



37. Genini S., Paternoster T., Costa A., Botti S., Luini M.V., Caprera A., Giuffra E. 2012: Identification of serum proteomic biomarkers for early porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) infection. *Proteome Sci.* 10, 48.
38. Gomez-Garcia V., Hernandez-Quero J., Rodriguez-Osorio M. 2003: Short report: human infection with *Trichinella britovi* in Granada, Spain. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68: 463–464.
39. Gondek M., Bień J., Nowakowski Z. 2017: Detection of experimental swine trichinellosis using commercial ELISA test. *Pol. J. Vet. Sci.* 20, 445–54.
40. Gong W., Jia J., Zhang B., Mi S., Zhang L., Xie X., Guo H., Shi J., Tu C. 2017: Serum metabolomic profiling of piglets infected with virulent classical swine fever virus. *Front. Microbiol.* 8, 731.
41. Gottstein B., Pozio E., Nöckler K. 2009: Epidemiology, diagnosis, treatment, and control of trichinellosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 127–145.
42. Gómez-Morales M.A., Ludovisi A., Amati M., Blaga R., Zivojinovic M., Ribicich M., Pozio E. 2012: A distinctive Western blot pattern to recognize *Trichinella* infections in humans and pigs. *In. J. Parasitol.* 42, 1017-1023.
43. Gómez-Morales M.A., Ludovisi A., Amati M., Cherchi S., Tonanzi D., Pozio E. 2018: Differentiation of *Trichinella species* (*Trichinella spiralis*/*Trichinella britovi* versus *Trichinella pseudospiralis*) using western blot. *Parasit. Vectors* 11, 631.
44. Gvozdenovic E., Mitrović N., Korac M., Dulovic O., Dakic Z., Katanic N., Svrtlih N. 2014: Analysis of clinical picture of trichinellosis in patients hospitalised in clinic for infectious diseases, Belgrade, Serbia. *Int. J. Infect. Dis.* 21S, s. 153.
45. Heo J.Y., Kim J.E., Dan Y., Kim Y.W., Kim J.Y., Cho K.H., Bae Y.K., Im S.S., Liu K.H., Song I.H., Kim J.R., Lee I.K., Park S.Y. 2018: Clusterin deficiency induces lipid accumulation and tissue damage in kidney. *J. Endocrinol.* 237, 175–191.
46. Herbert J., Hutchinson W.L., Carr J., Ives J., Jakob-Roetne R., Yamamura K., Suzuki M., Pepys M.B. 2002. Influenza virus infection is not affected by serum amyloid P component. *Mol. Med.* 8, 9–15.
47. Høgåsen K., Mollnes T.E., Brandtzaeg P. 1994: Low levels of vitronectin and clusterin in acute meningococcal disease are closely associated with formation of the terminal-complement complex and the vitronectin-thrombin-antithrombin complex. *Infect. Immun.* 62, 4874–4880.
48. Hong Y., Kim C.W., Ghebrehwet B. 1992: *Trichinella spiralis*: Activation of complement by infective larvae, adults, and newborn larvae. *Exp. Parasitol.* 74, 290–299.
49. Hurníková Z., Snábel V., Pozio E., Reiterová K., Hrcková G., Halásová D., Dubinský P. 2005: First record of *Trichinella pseudospiralis* in the Slovak Republic found in domestic focus. *Vet. Parasitol.* 128, 91–98.
50. Instrukcja Głównego Lekarza Weterynarii nr BP.0200.1.13.2021 z dnia 22 czerwca 2021 r określająca wykonanie badania mięsa na obecność włośni metodą wytrawiania zgodnie z

- wymaganiami Normy PN EN ISO 18743:2015-11 oraz minimalne wymagania dla laboratoriów wyznaczonych.
51. Ito Y., Toriuchi N., Yoshitaka T., Ueno-Kudoh H., Sato T., Yokoyama S., Nishida K., Akimoto T., Takahashi M., Miyaki S., Asahara H. 2010: The Mohawk homeobox gene is a critical regulator of tendon differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 10538–10542.
  52. Kalenka A., Feldmann R.E. Jr., Otero K., Maurer M.H., Waschke K.F., Fiedler F. 2006: Changes in the serum proteome of patients with sepsis and septic shock. *Anesth. Analg.* 103, 1522–1526.
  53. Kapel C.M.O., Gamble H.R. 2000: Infectivity, persistence, and antibody response to domestic and sylvatic *Trichinella* spp. in experimentally infected pigs. *Int. J. Parasit.* 30, 215–221.
  54. Kapel C.M.O., Webster P., Lind P., Pozio E., Henriksen S.A., Murrell K.D., Nansen P. 1998: *Trichinella spiralis*, *T. britovi*, and *T. nativa*: infectivity, larval distribution in muscle, and antibody response after experimental infection of pigs. *Parasitol. Res.* 84, 264–271.
  55. Karlsson H., Leanderson P., Tagesson C., Lindahl M. 2005: Lipoproteomics I: Mapping of proteins in low-density lipoprotein using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 5, 551–556.
  56. Kennedy M.W., Kuo Y.M. 1988: The surfaces of the parasitic nematodes *Trichinella spiralis* and *Toxocara canis* differ in the binding of post-C3 components of human complement by the alternative pathway. *Parasite Immunol.* 10, 459–463.
  57. Kim J.H., Lee H.Y., Ban G.Y., Shin Y.S., Park H.S., Ye Y.M. 2016: Serum clusterin as a prognostic marker of chronic spontaneous urticaria. *Medicine* 95, e3688.
  58. Kocięcka W., Boczoń K., Pozio E., van Knapen F. 2003: *Trichinella*. In: International Handbook of Foodborne Pathogens, (Ed. Miliotis M.D., Bier J.W.), Marcel Dekker, New York, 637 – 658.
  59. Koltai T. 2014: Clusterin: A key player in cancer chemoresistance and its inhibition. *Oncotargets Ther.* 7, 447–456.
  60. Korínková K., Kovarčík K., Pavlíčková Z., Svoboda M., Koudela B. 2008: Serological detection of *Trichinella spiralis* in swine by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) using an excretory-secretory (E/S) antigen. *Parasitol. Res.* 102, 1317–20.
  61. Kotula A.W., Murrell K.D., Acosta-Stein L., Lamb L. 1984: Distribution of *Trichinella spiralis* larvae in selected muscles and organs of experimentally infected swine. *J. Anim. Sci.* 58, 94–98.
  62. Krivokapich S.J., Pozio E., Gatti G.M., Prous C.L., Ribicich M., Marucci G., La Rosa G., Confalonieri V. 2012: *Trichinella patagoniensis* n. sp. (Nematoda), a new encapsulated species infecting carnivorous mammals in South America. *Int. J. Parasitol.* 42, 903–910.
  63. Kropáčková T., Šléglová O., Růžicková O., Vencovský J., Pavelka K., Šenolt L. 2018: Lower serum clusterin levels in patients with erosive hand osteoarthritis are associated with more pain. *BMC Musculoskelet. Disord.* 19, 264.

64. Levo Y., Shalit M., Tur-Kaspa R. 1982: Serum amyloid P-component as a marker of liver disease. *Am. J. Gastroenterol.* 77, 427–430.
65. Liu H., Liu W., Maltby K.M., Lan Y., Jiang R. 2006: Identification and developmental expression analysis of a novel homeobox gene closely linked to the mouse Twirler mutation. *Gene Expr. Patterns* 6, 632–636.
66. Liu R.D., Qi X., Sun G.G., Jiang P., Zhang X., Wang L.A., Liu X.L., Wang Z.Q., Cui J. 2016: Proteomic analysis of *Trichinella spiralis* adult worm excretory-secretory proteins recognized by early infection sera. *Vet. Parasitol.* 231, 43–46.
67. Liu Y., Zhang K., Zheng H., Shang Y., Guo J., Tian H., Lu G., Jin Y., He J., Cai X., Liu X. 2011: Proteomics analysis of porcine serum proteins by LC-MS/MS after foot-and-mouth disease virus (FMDV) infection. *J. Vet. Med. Sci.* 73, 1569–1572.
68. Maclean P.S., Tait R.C. 2007: Hereditary and acquired antithrombin deficiency: Epidemiology, pathogenesis and treatment options. *Drugs* 67, 1429–1440.
69. Malakauskas A., Kapel C.M.O., Webster P. 2001: Infectivity, persistence and serological response of nine *Trichinella* genotypes in rats. *Parasite* 8, 216–222.
70. Marco-Ramell A., Pato R., Peña R., Saco Y., Manteca X., Ruiz de la Torre J.L., Bassols A. 2011: Identification of serum stress biomarkers in pigs housed at different stocking densities. *Vet. J.* 190, e66–e71.
71. Mido S., Fath E.M., Farid, A.S., Nonaka N., Oku Y., Horii Y. 2012: *Trichinella spiralis*: Infection changes serum paraoxonase-1 levels, lipid profile, and oxidative status in rats. *Exp. Parasitol.* 131, 190–194.
72. Miller I., Wait R., Sipos W., Gemeiner M. 2009: A proteomic reference map for pig serum proteins as a prerequisite for diagnostic applications. *Res. Vet. Sci.* 86, 362–367.
73. Miyake H., Muramaki M., Furukawa J., Kurahashi T., Fujisawa M. 2010: Serum level of clusterin and its density in men with prostate cancer as novel biomarkers reflecting disease extension. *Urology* 75, 454–459.
74. Murrell K.D., Pozio E. 2011: Worldwide occurrence and impact of human trichinellosis, 1986–2009. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 2194–2202.
75. Näreaho A., Saari S., Meri S., Sukura A. 2009: Complement membrane attack complex formation and infectivity of *Trichinella spiralis* and *T. nativa* in rats. *Vet. Parasitol.* 159, 263–267.
76. Newkirk M.M., Apostolakis P., Neville C., Fortin P.R. 1999: Systemic lupus erythematosus, a disease associated with low levels of clusterin/apoJ, an antiinflammatory protein. *J. Rheumatol.* 26, 597–603.
77. Niessen R.W., Lamping R.J., Jansen P.M., Prins M.H., Peters M., Taylor F.B. Jr., de Vijlder J.J., ten Cate J.W., Hack C.E., Sturk A. 1997: Antithrombin acts as a negative acute phase

- protein as established with studies on HepG2 cells and in baboons. *Thromb. Haemost.* 78, 1088–1092.
78. Noursadeghi M., Bickerstaff M.C., Gallimore J.R., Herbert J., Cohen J., Pepys M.B. 2000: Role of serum amyloid P component in bacterial infection: protection of the host or protection of the pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 14584–14589.
  79. Nöckler K., Serrano F.J., Boireau P., Kapel C.M.O., Pozio E. 2005: Experimental studies in pigs on *Trichinella* detection in different diagnostic matrices. *Vet. Parasitol.* 132, 85–90
  80. Ożgo M., Lepczyński A., Herosimczyk A. 2015: Two-dimensional gel-based serum protein profile of growing piglets. *Turk. J. Biol.* 39, 320–327.
  81. Paraličová Z., Dubinský P., Kristian P., Jarčuška P. 2013: Unusual clinical course of trichinellosis with relapse. *Helminthologia* 50 142-146.
  82. Pavic S., Andric A., Sofronic-Milosavljevic L.J., Gnjatovic M., Mitić I, Vasilev S., Sparic R., Pavic A. 2020: *Trichinella britovi* outbreak: epidemiological, clinical, and biological features. *Med. Mal. Infect.* 50, 520-524.
  83. Pepys M.B., Dash A.C., Markham R.E., Thomas H.C., Williams B.D., Petrie, A. 1978: Comparative clinical study of protein SAP (amyloid P component) and C-reactive protein in serum. *Clin. Exp. Immunol.* 32, 119–124.
  84. Perales J., Angel Lasunción M., Cano A., Martín-Scapa M.A., Maties M., Herrera E. 1994: Changes in the lipid profile in chronic hepatopathies. *Med. Clin. (Barc.)* 102, 364–368.
  85. Petersen H.H., Nielsen J.P., Heegaard P.M.H. 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet. Res.* 35, 163–168.
  86. Picherot M., Oswald P.I., Cote M., Noeckler K., Le Guerhier F., Boireau P., Vallée I. 2017: Swine infection with *Trichinella spiralis*: comparative analysis of the mucosal intestinal and systemic immune responses. *Vet. Parasitol.* 143(2), 122-130.
  87. Poon S., Treweek T.M., Wilson M.R., Easterbrook-Smith S.B., Carver J.A. 2002: Clusterin is an extracellular chaperone that specifically interacts with slowly aggregating proteins on their off-folding pathway. *FEBS Lett.* 513, 259–266.
  88. Popović-Dragonjić L., Kocić I. 2018: An outbreak of human trichinellosis in the village of Subotinac near the town of Aleksinac. *Acta Fac. Med. Naiss.* 35, 140-148
  89. Pozio E. 2014: Searching for *Trichinella*: not all pigs are created equal. *Trends Parasitol.* 30, 4-11.
  90. Pozio E., Hoberg E., La Rosa G., Zarlenga D.S. 2009: Molecular taxonomy, phylogeny and biogeography of nematodes belonging to the *Trichinella* genus. *Infect. Genet. Evol.* 9, 606–616.
  91. Pozio E., Rinaldi L., Marucci G., Musella V., Galati F., Cringoli G., Boireau P., La Rosa G. 2009: Hosts and habitats of *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi* in Europe. *Int. J. Parasitol.* 39, 71-79.

92. Pozio E., Zarlenga D.S. 2005: Recent advances on the taxonomy, systematics and epidemiology of *Trichinella*. Int. J. Parasitol. 35, 1191–1204.
93. Pozio E., Meriadli G., Licata E., Della Casa G., Fabiani M., Amati M., Cherchi S., Ramini M., Faeti V., Interisano M., Lodovisi A., Rugna G., Marucci G., Tonanzi D., Gómez-Morales M.A. 2020: Differences in larval survival and IgG response patterns in long-lasting infections by *Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi* and *Trichinella pseudospiralis* in pigs. Parasit. Vectors 13, 520.
94. Prost E.K., Nowakowski Z. 1990: Detectability of *Trichinella spiralis* in muscles by pooled-sample-digestion-method. Fleischwirtschaft 70, 593–5.
95. Rodríguez-Piñeiro A.M., de la Cadena M.P., López-Saco A., Rodríguez-Berrocal F.J. 2006: Differential expression of serum clusterin isoforms in colorectal cancer. Mol. Cell. Proteom. 5, 1647–1657.
96. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 21 października 2010 r. w sprawie wymagań weterynaryjnych przy produkcji mięsa przeznaczonego na użytek własny (Dz.U. 2021 poz. 2059).
97. Rozporządzenie Wykonawcze Komisji (UE) 2015/1375 z dnia 10 sierpnia 2015 r. ustanawiające szczególne przepisy dotyczące urzędowych kontroli w odniesieniu do włośni (*Trichinella*) w mięsie. (Dz. U. L 212 z 11.08.2015, s.7).
98. Santrac V., Nedic D.N., Maric J., Nikolic S., Stevanovic O., Vasilev S., Cvetkovic J., Sofronic-Milosavljevic L. 2015: The first report of *Trichinella pseudospiralis* presence in domestic swine and *T. britovi* in wild boar in Bosnia and Herzegovina. Acta Parasitol. 60, 471–475.
99. Selkirk M.E., Smith V.P., Thomas G.R., Gounaris K. 1998: Resistance of filarial nematode parasites to oxidative stress. Int. J. Parasitol. 28, 1315–1332.
100. Serrano F.J., Pérez-Martín J.E., Reina D., Navarrete I., Kapel C.M.O. 1999: Influence of infection intensity on predilection sites in swine trichinellosis. J. Helminthol. 73, 251–254.
101. Sharma R., Thompson P.C., Hoberg E.P., Scandrett W.B., Konecni K., Harms N.J., Kukka P.M., Jung T.S., Elkin B., Mulders R., Larter N.C., Branigan M., Pongracz J., Wagner B., Kafle P., Lobanov V.A., Rosenthal B.M., Jenkins E.J., 2020: Hiding in plain sight: discovery and phylogeography of a cryptic species of *Trichinella* (Nematoda: *Trichinellidae*) in wolverine (*Gulo gulo*). Int. J. Parasitol. 50, 277-287.
102. Smith N.C., Bryant C. 1989: Free radical generation during primary infections with *Nippostrongylus brasiliensis*. Parasite Immunol. 11, 147–160.
103. Spósito A.C., Vinagre C.G., Pandullo F.L., Mies S., Raia S., Ramires J.A. 1997: Apolipoprotein and lipid abnormalities in chronic liver failure. Braz. J. Med. Biol. Res. 30, 1287–1290.
104. Srikanth K., Lee E., Kwon A., Shin J., Chung H. 2017: A comparative proteomic analysis of blood serum for developmental stages in pigs. Anim. Genet. 48, 531–543.

105. Stadnyk A.W., Kearsley J.A. 1996: Pattern of proinflammatory cytokine mRNA expression during *Trichinella spiralis* infection of the rat. *Infect. Immun.* 64, 5138–5143.
106. Stankiewicz M., Sokolska G., Pilarczyk A., Sadowska D., Jeska E.L. 1989. Lack of correlation between in vitro and in vivo activation of complement in mice by infective *Trichinella spiralis* larvae. *J. Parasitol.* 75, 647–649.
107. Stuart W.D., Krol B., Jenkins S.H., Harmony J.A. 1992: Structure and stability of apolipoprotein J-containing high-density lipoproteins. *Biochemistry* 31, 8552–8559.
108. Sun H.Y., Chen S.F., Lai M.D., Chang T.T., Chen T.L., Li P.Y., Shieh D.B., Young K.C. 2010: Comparative proteomic profiling of plasma very-low-density and low-density lipoproteins. *Clin. Chim. Acta* 411, 336–344.
109. Sun J.F., Shi Z.X., Guo H.C., Li S., Tu C.C. 2011: Proteomic analysis of swine serum following highly virulent classical swine fever virus infection. *Virology* 438, 107.
110. Sun X.M., Guo K., Hao C.H., Zhan B., Huang J.J., Zhu X. 2019: *Trichinella spiralis* excretory–secretory products stimulate host regulatory T cell differentiation through activating dendritic cells. *Cells* 8, 1404.
111. Światowa Organizacja Zdrowia Zwierząt (OIE) (2018) – Trichinellosis. W: Podręcznik badań diagnostycznych i szczepionek dla zwierząt lądowych, 8 Ed. OIE, Paryż, Rozdział 3.1.21. (web format).
112. Tada K., Suzuki H., Sato Y., Morishima Y., Nagano I., Ishioka H., Gomi H. 2018: Outbreak of *Trichinella* T9 infections associated with consumption of bear meat, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 24, 1532–1535.
113. Takeuchi J.K., Bruneau B.G. 2007: *Irx11*, a divergent Iroquois homeobox family transcription factor gene. *Gene Expr. Patterns* 7, 51–56.
114. Thio M., Blokhuis B.R., Nijkamp F.P., Redegeld F.A. 2008: Free immunoglobulin light chains: a novel target in the therapy of inflammatory diseases. *Trends. Pharmacol. Sci.* 29, 170–174.
115. Tint D., Cocuz M.E., Ortan O.F., Niculescu M.D., Radoi M. 2009: Cardiac involvement in trichinellosis: a case of left ventricular thrombosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81, 313–316.
116. Trougakos I.P., Lourda, M., Antonelou M.H., Kletsas D., Gorgoulis V.G., Papassideri I.S., Zou Y., Margaritis L.H., Boothman D.A., Gonos E.S. 2009: Intracellular clusterin inhibits mitochondrial apoptosis by suppressing p53-activating stress signals and stabilizing the cytosolic Ku70-Bax protein complex. *Clin. Cancer Res.* 15, 48–59.
117. Trougakos I.P., Poulakou M., Stathatos M., Chalikia A., Melidonis A., Gonos E.S. 2002: Serum levels of the senescence biomarker clusterin/apolipoprotein J increase significantly in diabetes type II and during development of coronary heart disease or at myocardial infarction. *Exp. Gerontol.* 37, 1175–1187.
118. Tschopp J., French L.E. 1994: Clusterin: modulation of complement function. *Clin. Exp. Immunol.* 97 (Suppl. 2), 11–14.

119. Ursell P.C., Habib A., Babchick O., Rottolo R., Despommier D., Fenoglio J.J. 1984: Myocarditis caused by *Trichinella spiralis*. Arch. Pathol. Lab. Med. 108, 4–5.
120. Wang L., Cui J., Hu D.D., Liu R.D., Wang Z.Q. 2014: Identification of early diagnostic antigens from major excretory-secretory proteins of *Trichinella spiralis* muscle larvae using immunoproteomics. Parasit. Vectors 7, 40.
121. Wang L., Wang Z.Q., Hu D.D., Cui, J. 2013: Proteomic analysis of *Trichinella spiralis* muscle larval excretory-secretory proteins recognized by early infection sera. Biomed. Res. Int. 2013, 139745.
122. Wang N., Bai X., Ding J., Lin J., Zhu H., Luo X., Fu Z., Zhu C., Jia H., Liu M., Liu X. 2021: *Trichinella* infectivity and antibody response in experimentally infected pigs. Vet Parasitol. 297, 109111.
123. Wang N., Bai X., Tang B., Yang Y, Wang X., Zhu H., Luo X., Yan H., Jia H., Liu M., Liu X. 2020: Primary characterization of the immune response in pigs infected with *Trichinella spiralis*. Vet. Res. 51, 17.
124. Wang Y., Liu Y.H., Mai S.J., He L.J., Liao Y.J., Deng H.X., Guan X.Y., Zeng Y.X., Kung H.F., Xie D. 2010: Evaluation of serum clusterin as a surveillance tool for human hepatocellular carcinoma with hepatitis B virus related cirrhosis. J. Gastroenterol. Hepatol. 25, 1123–1128.
125. Wu Z., Sofronic-Milosavljevic L.J., Nagano I., Takahashi Y. 2008: *Trichinella spiralis*: nurse cell formation with emphasis on analogy to muscle cell repair. Parasit. Vectors 1, 27.
126. Yang J., Pan W., Sun X., Zhao X., Yuan G., Sun Q., Huang J., Zhu X. 2015: Immunoproteomic profile of *Trichinella spiralis* adult worm proteins recognized by early infection sera. Parasit. Vectors 8, 20.
127. Yin C., Liu W., Liu Z., Huang Y., Ci L., Zhao R., Yang X. 2017: Identification of potential serum biomarkers in pigs at early stage after lipopolysaccharide injection. Res. Vet. Sci. 111, 140–146.
128. Yu Y.R., Deng M.J., Lu W.W., Jia M.Z., Wu W., Qi Y.F. 2013: Systemic cytokine profiles and splenic toll-like receptor expression during *Trichinella spiralis* infection. Exp. Parasitol. 134, 92–101.
129. Zhang H., Kim J.K., Edwards C.A., Xu Z., Taichman R., Wang C.Y. 2005: Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax. Nat. Cell. Biol. 7, 909–915.
130. Zhang L.Y., Ying W.T., Mao Y.S., He H.Z., Liu Y., Wang H.X., Liu F., Wang K., Zhang D.C., Wang Y., Wu M., Qian X.H., Zhao X.H. 2004: Loss of clusterin both in serum and tissue correlates with the tumorigenesis of esophageal squamous cell carcinoma via proteomics approaches. World J. Gastroenterol. 9, 650–654.
131. Zhao L., Shao S., Chen Y., Sun X., Sun R., Huang J., Zhan B., Zhu X. 2017: *Trichinella spiralis* calreticulin binds human complement C1q As an immune evasion strategy. Front. Immunol. 8, 636

**5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.**

W 2018 roku, dzięki uzyskaniu stypendium Fundacji A.P. Dekabana, przebywałem przez 5 miesięcy jako Visiting Assistant Professor w Faculty of Food and Land Systems, University of British Columbia (UBC) w Vancouver, w Kanadzie. Podczas pobytu, pod nadzorem dr. Xiaonan'a Lu, realizowałem projekt pt. „Determination of antimicrobial resistance of *Campylobacter* bacteria in environment and foods in Canada”. Celem badań była ocena prevalencji termotolerancyjnych *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli* w surowym mięsie drobiowym dostępnym w handlu detalicznym na obszarze miasta Vancouver. W badaniach tych przeprowadzałem izolację drobnoustroju z różnych części tuszek kurczaków, identyfikację gatunkową *Campylobacter* spp. z wykorzystaniem techniki PCR oraz ocenę antybiotykooporności z wykorzystaniem metody mikrorozcieńczeń. Ponadto dokonałem oceny czułości dwóch różnych podłoży selektywnych do wykrywania *Campylobacter jejuni* oraz *Campylobacter coli* stosując wyjałowione mięso drobiowe inokulowane różną liczbą bakterii. Pobyt w University of British Columbia znacząco poszerzył moje umiejętności z zakresu klasycznych i molekularnych metod mikrobiologicznych wykorzystywanych w badaniu bakterii z rodzaju *Campylobacter*. Nabyte doświadczenie i wiedza pozwoliły mi również na implementację technik służących do izolacji i identyfikacji *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli* w Katedrze Higieny Żywności Zwierzęcego Pochodzenia.

W 2019 roku w ramach programu ERASMUS STT odbyłem szkolenie w Università di Pisa (Piza, Włochy), którego celem było zbadanie wpływu olejków eterycznych na wzrost i przeżywalność *Listeria monocytogenes* oraz doskonalenie technik służących do oceny produkcji biofilmu przez ten drobnoustrój. Ponadto w trakcie mojego pobytu zapoczątkowano współpracę dotyczącą możliwości wykorzystania techniki MALDI-TOF do identyfikacji drobnoustrojów *Campylobacter* spp. izolowanych z tusz dzików we Włoszech. Wyniki powyższych badań ukażą się we wspólnej publikacji naukowej.

Współpracuję również z Instytutem Parazytologii Polskiej Akademii Nauk. W ramach tej współpracy dokonano oceny właściwości immunoprotekcyjnych i przydatności diagnostycznej rekombinowanego białka *Trichinella britovi* „multi-cystatin-like domain” (rTbCLP). „Multi-cystatin-like domain” jest białkiem wytwarzanym przez *Trichinella* w różnych fazach cyklu rozwojowego. Powstaje ono w stichosomie, po czym uwalniane jest przez poszczególne stadia rozwojowe pasożyta jako składnik antygeny ekskrecyjno-sekrecyjnego. Stosując połączone techniki elektorforezy dwukierunkowej (2-DE), immunoblotingu oraz LC-MS/MS wykazano również, że białko to zostało zidentyfikowane jako składnik antygeny ES larw mięśniowych *T. britovi* reagujący z przeciwciałami anti-*Trichinella* w surowicach świń zarażonych doświadczalnie *Trichinella britovi*. Cystatyny, będące inhibitorami proteinaz cysteinowych i wytwarzane przez nicienie pasożytnicze, wykazują właściwości



immunomodulujące, zwiększając produkcję przeciwzapalnej IL-10 i hamując produkcję VPEs (*ang.* vacuolar processing enzymes; legumains), ograniczając tym samym ekspresję MHC-II. Stąd celem badań było określenie immunoprotekcyjnych właściwości rekombinowanego białka multi-cystatin-like domain wyprodukowanego z użyciem eukariotycznego systemu ekspresyjnego (*Pichia pastoris*) oraz ocena jego przydatności w diagnostyce włośnicy świń wywołanej *Trichinella britovi*. Badania wykazały, że immunizacja myszy z użyciem rTbCLP spowodowała istotną redukcję obciążenia larwami (o 46.9%) mięśni zwierząt doświadczalnie zarażonych *T. britovi*. Stwierdzono również statystycznie istotnie wyższy poziom IFN- $\gamma$ , IL-4 i IL-10 w splenocytach myszy immunizowanych rTbCLP przed i po zarażeniu *T. britovi* w porównaniu do grupy kontrolnej. W surowicy myszy immunizowanych rTbCLP wykryto również specyficzne przeciwciała anti-TbCLP przed ich zarażeniem *T. britovi*, a po ich zarażeniu poziom tych przeciwciał był statystycznie istotnie wyższy w porównaniu do zarażonej i nieimmunizowanej grupy kontrolnej. Wykazano ponadto przydatność otrzymanego białka w diagnostyce włośnicy świń; test ELISA oparty na rTbCLP był bowiem w stanie wcześniej wykryć swoiste przeciwciała anti-*Trichinella* IgG w surowicy świń zarażonych doświadczalnie dawką 5000 larw mięśniowych *T. britovi* (24 dzień po zarażeniu) w porównaniu do komercyjnego zestawu ES ELISA. Wyniki przeprowadzonych badań opublikowano w artykule:

- Stachyra A., Zawistowska-Deniziak A., Basałaj K., Grzelak S., **Gondek M.**, Bień-Kalinowska J. (2019). The immunological properties of recombinant multi-cystatin-like domain protein from *Trichinella britovi* produced in yeast. *Front. Immunol.* 10:2420.

W prowadzonych przeze mnie badaniach wraz z pracownikami Instytutu Parazytologii PAN wykazałem, że test „in-house” ELISA oparty na antygenie ekskrecyjno-sekrecyjnym (ES) larw mięśniowych (ML) *T. spiralis* oraz przeznaczony do wykrywania specyficznych przeciwciał anti-*Trichinella* IgG komercyjny zestaw ELISA PrioCHECK® *Trichinella* Ab umożliwiając wykrycie włośnicy u świń zarażonych niskimi dawkami *T. spiralis* (300 larw mięśniowych/świnie) w 30 dniu po ich zarażeniu i nadają się do badań monitoringowych stad świń co jest zgodne z rekomendacją Międzynarodowej Komisji Włośnicowej oraz Rozporządzeniem Komisji (UE) 2015/1375. Ze względu jednak na przedłużoną serokonwersję, badanie stada powinno być wykonane minimum dwukrotnie w odstępie 30-41 dni. Stwierdzono również, że w serologicznej diagnostyce włośnicy świń zarażonych niskimi dawkami *T. spiralis*, test Western blot oparty na antygenie ES larw mięśniowych *T. spiralis* może być skutecznym narzędziem potwierdzającym wyniki uzyskane testem ELISA. Ponadto stosując test Western blot zaobserwowano, że surowica zarażonych świń reagowała z białkami antygeny ES *T. spiralis* ML o masach cząsteczkowych w zakresie od 30 do 88 kDa, najczęściej jednak rozpoznawanymi białkami były białka o masie 45, 49 i 60 kDa. Reakcja surowicy z białkami ES *T. spiralis* obserwowana również była u niektórych osobników wcześniej niż pojawienie się przeciwciał anti-*Trichinella* IgG w teście ELISA. Powyższe badania prowadzone były w ramach mojej pracy doktorskiej, a wyniki zostały opublikowane w następujących artykułach:

- **Gondek M.**, Bień J., Nowakowski Z. (2017). Detection of experimental swine trichinellosis using commercial ELISA test. *Pol. J. Vet Sci.* 20(3), 445-454.
- **Gondek M.**, Bień J., Nowakowski Z. (2018). Use of ELISA and Western blot for serological detection of antibodies to E-S antigens of *Trichinella spiralis* muscle larvae in sera of swine experimentally infected with *Trichinella spiralis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 203, 13-20.

Podjąłem również współpracę z Katedrą Fizjologii, Cytobiologii i Proteomiki Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie w zakresie proteomicznych analiz surowic świń doświadczalnie zarażonych *T. spiralis*, *T. britovi* i *T. pseudospiralis*. Efektem tej współpracy jest publikacja wchodząca w skład cyklu, stanowiącego osiągnięcie o którym mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce:

- **Gondek M.**, Herosimczyk A., Knysz P., Ożgo M., Lepczyński A., Szkucik K. (2020). Comparative proteomic analysis of serum from pigs experimentally infected with *Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi* and *Trichinella pseudospiralis*. *Pathogens*, 9(1), 55.

Wśród krajowych ośrodków z którymi współpracuję jest również Katedra Nauk Przedklinicznych i Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. W ramach tej współpracy dokonano oceny poziomu białek ostrej fazy w surowicy świń doświadczalnie zarażonych *T. spiralis*, *T. britovi* i *T. pseudospiralis*. W oparciu o przeprowadzone badania została przygotowana publikacja wchodząca w skład cyklu stanowiącego osiągnięcie o którym mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, i która została nagrodzona nagrodą I stopnia Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych za rok 2020:

- **Gondek M.**, Knysz P., Pomorska-Mól M., Ziomek M., Bień-Kalinowska J. (2020). Acute phase protein pattern and antibody response in pigs experimentally infected with a moderate dose of *Trichinella spiralis*, *T. britovi*, and *T. pseudospiralis*. *Vet. Parasitol.* 288, 109277.

## **6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę.**

W ramach mojej działalności popularyzującej naukę trzykrotnie brałem czynny udział (jako kierownik lub współorganizator) w Lubelskim Festiwalu Nauki organizując dla uczestników wykład oraz zajęcia praktyczne pt:

1. „Co warto wiedzieć o rybach konsumpcyjnych ?”
2. „Włośnica – groźna zoonoza przenoszona przez żywność pochodzenia zwierzęcego”. W części teoretycznej zajęć, słuchaczom przekazano podstawowe informacje na temat biologii i cyklu rozwojowego pasożyta. Podczas zajęć praktycznych uczestnicy mogli zapoznać się

referencyjną metodą wykrywania pasożyta w mięsie oraz obserwować larwy mięśniowe włośni pod trychinoskopem.

Jestem również współautorem rozdziału w monografii naukowej, w której przedstawiono najważniejsze aspekty prawne dotyczące rejestracji, zatwierdzania i przeprowadzania urzędowych kontroli podmiotów prowadzących działalność w zakresie hodowli zwierząt akwakultury i programów nadzoru i zwalczania chorób mięczaków oraz opisano zasady sprawowania nadzoru higienicznego nad pozyskiwaniem, wprowadzaniem do obrotu i przetwórstwem mięczaków. W monografii tej przedstawiono również m.in. zasady klasyfikacji obszarów produkcyjnych i stref sanitarnych małży oraz skupiono się na wymaganiach higienicznych obowiązujących w przetwórstwie ślimaków lądowych. Opracowany rozdział może stanowić przydatny przewodnik zarówno dla hodowców jak i urzędowych lekarzy weterynarii sprawujących nadzór nad produkcją i przetwarzaniem mięczaków w Polsce.

1. Ziomek M., Paszkiewicz W., Pyz-Lukasik R., Drozd Ł., **Gondek M.**, Knysz P., Bełkot Z.: Zasady sprawowania nadzoru weterynaryjnego nad produkcją, wprowadzaniem na rynek i przetwórstwem mięczaków. Mięczaki: potencjalne zagrożenie dla zdrowia konsumenta / pod redakcją Krzysztofa S. Szkucika Lublin 2017, Lubelskie Towarzystwo Naukowe, s. 157-175, ISBN 978-83-62025-33-6.

Pełniłem funkcję redaktora monografii dotyczącej bezpieczeństwa regionalnych i tradycyjnych produktów mlecznych. W opracowaniu przedstawiono technologiczne aspekty wytwarzania regionalnych i tradycyjnych produktów mlecznych. Zostały omówione potencjalne zagrożenia mikrobiologiczne oraz chemiczne związane z tą grupą środków spożywczych, a także zestawiono unormowania prawne dotyczące ich pozyskiwania.

1. Bezpieczeństwo regionalnych i tradycyjnych produktów mlecznych - stan obecny i perspektywy / pod red. W. Paszkiewicza i **M. Gondka**. Lublin 2018, Lubelskie Towarzystwo Naukowe, 106 s, ISBN 978-83-62025-34-3.

Jako sekretarz oraz członek komitetu organizacyjnego aktywnie brałem udział w przygotowaniu trzech konferencji organizowanych przez Sekcję Higieny Żywności i Weterynaryjnej Ochrony Zdrowia Publicznego Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych oraz Katedrę Higieny Żywności Zwierzęcego Pochodzenia Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie:

- „Mięczaki – potencjalne zagrożenie dla zdrowia konsumenta”. Lublin, 2 czerwca 2017.
- „Jakość zdrowotna regionalnych i tradycyjnych produktów mlecznych”. Lublin, 8 czerwca 2018.
- „Zatrucia pokarmowe stałym zagrożeniem zdrowia publicznego”. Lublin, 31 maja 2019.

Od 2020 roku pełnię funkcję redaktora statystycznego w czasopiśmie „Medycyna Weterynaryjna”.

Przygotowałem również instrukcję przeprowadzania hospitacji, która zamieszczona została w Księdze Jakości Kształcenia Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Brałem czynny udział w przygotowaniu Wydziałowego Raportu Samooceny, opracowując kryterium 5 (infrastruktura i zasoby edukacyjne wykorzystywane w realizacji programu studiów oraz ich doskonalenie) dotyczące zasobów bibliotecznych, informatycznych i edukacyjnych dostępnych dla studentów Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Uczestniczyłem w przygotowaniu Wydziałowego Raportu Samooceny (rozdział „Learnig resources”) na potrzeby European Association of Establishments for Veterinary Education (EAEVE). Czynnie uczestniczyłem również w procedurze akredytacji Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego przeprowadzonej przez Europejskie Stowarzyszenie Wydziałów Medycyny Weterynaryjnej.

Od roku 2020 jestem członkiem Kolegium Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Jestem również członkiem Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych od 2016 roku.

Od początku pracy w Katedrze Higieny Żywności Zwierzęcego Pochodzenia w 2011 roku prowadzę ćwiczenia ze studentami kierunku weterynaria z przedmiotów: ochrona zdrowia publicznego (rok III, studia stacjonarne i niestacjonarne), higiena zwierząt rzeźnych i mięsa (rok IV, studia stacjonarne i niestacjonarne), higiena mleka (rok IV, studia stacjonarne i niestacjonarne), higiena produktów pochodzenia zwierzęcego (rok V, studia stacjonarne). Od roku 2014 prowadzę zajęcia z przedmiotu mikrobiologia żywności realizowanego w ramach kierunku bezpieczeństwo i certyfikacja żywności (rok II, stopień I) na Wydziale Biologii, Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Na tym samym Wydziale, od roku 2015, prowadzę również ćwiczenia z przedmiotu higiena i bezpieczeństwo żywności zwierzęcego pochodzenia na kierunku bezpieczeństwo i certyfikacja żywności (rok III, stopień I). Od roku 2017 prowadzę ćwiczenia z przedmiotu urzędowe nadzory nad bezpieczeństwem żywności na kierunku bezpieczeństwo i certyfikacja żywności (rok II, stopień II) organizowanym przez Wydział Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki. W latach 2012-2018 prowadziłem ćwiczenia z przedmiotu higiena surowców i produktów spożywczych na kierunku towaroznawstwo na Wydziale Agrobioinżynierii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. W latach 2018-2020 byłem odpowiedzialny za przedmiot hygiene of food of animal origin realizowany z anglojęzycznymi studentami programu Erasmus. Od roku 2021 jestem osobą odpowiedzialną za przedmiot hygiene of slaughter animals and meat (dla studentów anglojęzycznych kierunku weterynaria oraz studentów programu Erasmus) dla którego opracowałem program nauczania. Ponadto od roku 2021 prowadzę zajęcia ze studentami kierunku analityka weterynaryjna w ramach przedmiotu metody analityczne w badaniu żywności pochodzenia zwierzęcego.

Pełnię także funkcję promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim lek. wet. Przemysława Knysza (rozprawa doktorska pt. „Bakterie rodzaju *Enterococcus* izolowane z tusz zwierząt rzeźnych i dziczyzny jako potencjalne zagrożenie zdrowia konsumenta”).

## **7. Inne ważne informacje dotyczące kariery zawodowej wnioskodawcy.**

### **7.1. Nagrody i wyróżnienia**

7.1.1. Nagroda Prezesa Oddziału Polskiej Akademii Nauk w Lublinie za najlepszą pracę naukową dla młodych pracowników naukowych na terenie Lubelszczyzny w roku 2020.

7.1.2. Nagroda I stopnia Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych za rok 2020 za oryginalną pracę kliniczną (wykonaną na zwierzętach, z wyłączeniem zwierząt laboratoryjnych), rozwiązującą problem kliniczny/diagnostyczny/terapeutyczny.

7.1.3. Nagroda II stopnia Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych za rok 2020 za oryginalną pracę kliniczną (wykonaną na zwierzętach, z wyłączeniem zwierząt laboratoryjnych), rozwiązującą problem kliniczny/diagnostyczny/terapeutyczny.

7.1.4. Nagroda indywidualna II stopnia Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie za osiągnięcia naukowe w latach 2018-2020.

### **7.2. Szkolenia podnoszące kompetencje zawodowe**

7.2.1. Szkolenie pt. „Wykrywanie i identyfikacja *Campylobacter* spp.”. Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Puławy, 14.05.2018-18.05.2018 r.

7.2.2. Szkolenie pt. „System zarządzania wg normy PN-EN ISO/IEC 17025 w laboratorium badawczym”. Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin, 2016 r.

7.2.3. Szkolenie łączone dla osób wykonujących czynności związane z wykorzystaniem zwierząt do celów naukowych i edukacyjnych. Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, 2015 r.

7.2.4. Szkolenie pt. „Badanie mięsa świń, dzików, koni i nutrii metodą wytrawiania próby zbiorczej z zastosowaniem metody magnetycznego mieszania”. Weterynaryjne Centrum Kształcenia Podyplomowego, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Puławy, 22.03.2012-23.03.2012 r.

7.2.5. Staż absolwencki z zakresu sprawowania nadzoru nad ubojem świń i bydła. Zakład rzeźniczo-wędliniarski Ernestyn Janeta, Lubomia (powiat wodzisławski, województwo śląskie), czerwiec-sierpień 2011 r.

### **7.3. Kierowanie projektami badawczymi**

7.3.1. „Zastosowanie strategii shotgun label-free LC-MS/MS w proteomicznej analizie surowic świń doświadczalnie zarażonych *Trichinella spiralis* (T1), *Trichinella pseudospiralis* (T4) i *Trichinella britovi* (T3)”. Projekt finansowany w ramach wewnętrznego konkursu w Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie ze środków na naukę przyznanych na działalność służącą rozwojowi młodych naukowców. Lata realizacji 2019-2023.

7.3.2. „Proteomiczna analiza profili białkowych surowic świń doświadczalnie zarażonych *Trichinella spiralis*, *Trichinella pseudospiralis* i *Trichinella britovi*”. Projekt finansowany przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu Miniatura 1. Decyzja Dyrektora Narodowego Centrum Nauki nr DEC-2017/01/X/NZ6/00582. Lata realizacji: 2017-2019.

#### **7.4. Recenzje artykułów naukowych**

Regularnie recenzuję artykuły naukowe dla czasopism: Vaccines, Research in Veterinary Science, Scientific Reports, Acta Tropica, Genes, Acta Parasitologica, Pathogens, Parasites & Vectors, Animals, Foods, International Journal of Molecular Sciences, International Journal of Environmental Research and Public Health, Microorganisms, Nutrients, Medycyna Weterynaryjna, Journal of Veterinary Research, Animal Biotechnology.

#### **7.5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych**

Tematyka prowadzonych przeze mnie pozostałych badań naukowych oraz pozostały dorobek publikacyjny obejmuje następujące zagadnienia:

1. Występowanie zmian chorobowych i odchyłeń jakościowych w tuszach świń i zwierząt łownych.
2. Skład chemiczny i wartość odżywcza odzyskanego mechanicznie mięsa z kurcząt i gęsi.
3. Jakość mikrobiologiczna jaj spożywczych.
4. Zawartość ubichinonu Q10 i białka w mięsie królików w zależności od rodzaju mięśnia i systemu hodowli zwierząt.
5. Zawartość selenu w mięśniach i narządach wewnętrznych koni rzeźnych.
6. Wpływ ekstraktów z nasion grejpfruta i tarczycy bajkalskiej na skład chemiczny i cechy sensoryczne mięsa indyczego.
7. Jakość zdrowotna jadalnych produktów pozyskiwanych ze ślimaków w Polsce.
8. Wartość odżywcza i jakość mikrobiologiczna serów wyprodukowanych metodami tradycyjnymi w Polsce.
9. Jakość mikrobiologiczna i skład chemiczny mięsa bobrów (*Castor fiber* L.).
10. Wartość odżywcza mięsa ryb – artykuł przeglądowy.

##### 7.5.1. Występowanie zmian chorobowych i odchyłeń jakościowych w tuszach świń i zwierząt łownych.

Na bezpieczeństwo i przydatność spożywczą mięsa mają wpływ stany chorobowe i odchylenia jakościowe stwierdzone podczas badania poubojowego. Stąd celem badań, w których brałem udział, była analiza wyników badania poubojowego świń oraz wybranych gatunków zwierząt łownych takich jak łosie, jelenie, daniiele, dziki, sarny, zające oraz ptactwo łowne. Dane dotyczące wyników badania sanitarno-weterynaryjnego opracowano na podstawie rocznych sprawozdań sporządzanych przez Główny Inspektorat Weterynarii. W analizie wyników badań uwzględniono liczbę zwierząt zbadanych, liczbę tusz w których stwierdzono zmiany chorobowe i liczbę tusz uznanych za niezdatne do spożycia. Wyniki analizowano osobno dla świń oraz dzików, natomiast łosie, jelenie, daniiele i sarny zostały ujęte razem jako zwierzyna płowa. Oceniając przyczyny zmian chorobowych i niezdatności do spożycia wyniki ujęto w następujących grupach: dla świń - choroby zakaźne oraz inwazyjne, odchylenia jakościowe, zatrucia środkami chemicznymi i nowotwory; dla zwierząt łownych - choroby zakaźne, choroby pasożytnicze i odchylenia jakościowe. W grupie odchyleń jakościowych uwzględniono: nadmierne wychudzenie, niedostateczne wykrwawienie oraz rozkład gnilny. Przyczyny i analizę wielkości konfiskat w badanych okresach czasowych (2000 – 2011) przedstawiono w następujących pracach:

- Szkucik K., **Gondek M.**, Bełkot Z. (2012). Występowanie zmian chorobowych i odchyleń jakościowych w tuszach świń rzeźnych w Polsce w latach 2001–2011. *Życie Wet.* 87(9), 770-773
- Szkucik K., Bełkot Z., **Gondek M.** (2012) Występowanie zmian chorobowych i odchyleń jakościowych w tuszach zwierząt łownych w Polsce w latach 2000–2011. *Med. Weter.* 68(12), 755-761.

#### 7.5.2. Skład chemiczny i wartość odżywcza mięsa odzyskanego mechanicznie z kurcząt i gęsi.

Drobiowe mięso odzyskane mechanicznie (DMOM) jest głównym surowcem do produkcji wędlin homogenizowanych, drobno rozdrobnionych, pasztetów i hamburgerów drobiowych. Otrzymuje się je na drodze chemicznej (metody hydrolityczne i enzymatyczne) lub fizycznej (metody skrobakowate, hydromechaniczne, cierne, ekstrakcyjne i tłoczniowe). Podstawowym surowcem do produkcji DMOM są całe tuszki kur po okresie nieśności i tuszki ciężkich kurcząt brojlerów, grzbiety, skrzydła i szyje albo korpusy po wykrojeniu mięśni piersiowych. Drób grzebiący jest dominującym surowcem do produkcji DMOM, natomiast gęsi i kaczki wykorzystywane są jedynie okresowo po jesiennym sezonie tuczu. Wybór metody uzyskiwania DMOM, jak też dobór surowca do produkcji mają istotny wpływ na skład chemiczny produktu końcowego. Stąd celem przeprowadzonych badań, w których uczestniczyłem, było określenie składu chemicznego i wartości odżywczej mięsa odzyskanego mechanicznie w zależności od gatunku drobiu i w porównaniu do mięsa wykrawanego ręcznie. Badania przeprowadzono na dwóch rodzajach DMOM - kurzym i gęsim (pozyskanym w wyniku separacji ciśnieniowej twardej) oraz dwóch rodzajach mięsa wykrawanego ręcznie (kurcząt i gęsi), na które

składały się połączone próbki mięśni piersiowych i udowych. Oznaczenia składu chemicznego dotyczyły: zawartości białka całkowitego tłuszczu, wody, wapnia, fosforu, składu aminokwasowego oraz profilu kwasów tłuszczowych. Wartość biologiczną białek określono metodą obliczeniową za pomocą analizy składu aminokwasowego z wykorzystaniem dwóch wskaźników: wskaźnika aminokwasu ograniczającego (CS) wg Mitchella-Blocka oraz zintegrowanego wskaźnika aminokwasów egzogennych (EAA) wg Osera. Oznaczenia zawartości białka wykazały istotne różnice zarówno w odniesieniu do dwóch rodzajów DMOM, jak i w porównaniu do mięsa wykrawanego ręcznie. MOM gęsi zawierało istotnie najmniej białka ( $9,73\% \pm 1,11$ ) w porównaniu do wszystkich badanych rodzajów mięsa ( $P < 0,05$ ). Zawartość białka w tym mięsie była prawie 1,5-krotnie niższa niż w MOM kurcząt i ponad dwukrotnie niższa w porównaniu do obu rodzajów mięsa wykrawanego ręcznie. Dwa oceniane rodzaje mięsa uzyskanego mechanicznie różniły się także istotnie pod względem zawartości tłuszczu zarówno pomiędzy sobą, jak i w porównaniu z mięsem wykrawanym ręcznie ( $P < 0,05$ ). MOM gęsi cechowała istotnie najwyższa zawartość tego składnika ( $39,87\% \pm 3,66$ ); była ona ponad dwukrotnie wyższa w porównaniu z MOM kurcząt ( $14,07\% \pm 1,30$ ). Zarówno MOM kurcząt, jak i gęsi cechował wyższy poziom tłuszczu niż w mięsie wykrawanym ręcznie. Badane rodzaje DMOM różniły się istotnie pod względem zawartości wody ( $P < 0,05$ ), której poziom był 1,5-razy wyższy w mięsie kurcząt ( $70,29\% \pm 0,94$ ) w porównaniu do mięsa gęsi ( $49,74\% \pm 3,04$ ). Wszystkie rodzaje DMOM zawierały istotnie mniej wody niż mięso wykrawane ręcznie ( $P < 0,05$ ). Przeprowadzone badania wykazały również istotną różnicę ( $P < 0,05$ ) w zawartości wapnia, którego sześciokrotnie więcej stwierdzono w MOM kurcząt w porównaniu do MOM gęsi i 16-krotnie w porównaniu z mięsem wykrawanym ręcznie. W badaniach nie stwierdzono natomiast różnic pomiędzy zawartością fosforu w obu badanych rodzajach DMOM. Zawartość tego pierwiastka była jednak dwukrotnie niższa w badanym MOM w porównaniu z mięsem wykrawanym ręcznie. Poziom aminokwasów w białku MOM kurcząt w porównaniu do gęsi był istotnie wyższy ( $P < 0,05$ ). Istotnych różnic nie stwierdzono jedynie w zawartości proliny, glicyny, cysteiny i metioniny. Istotne różnice zaznaczyły się także pomiędzy składem aminokwasowym DMOM a mięsa wykrawanego ręcznie ( $P < 0,05$ ) z wyjątkiem glicyny, której poziom w białku wymienionych rodzajów mięsa kurcząt nie różnił się. Poziom aminokwasów w białku obu rodzajów DMOM był istotnie niższy ( $P < 0,05$ ) niż w mięsie wykrawanym ręcznie. Aminokwasami ograniczającymi (CS) pełną przyswajalność białka zarówno w DMOM, jak i w mięsie kurcząt wykrawanym ręcznie były aminokwasy siarkowe (metionina i cysteina), zaś dla gęsi aminokwasy aromatyczne (fenyloalanina i tyrozyna). Opierając się na wzorcu FAO składu aminokwasowego białka, uzyskano dla wszystkich ocenianych rodzajów mięsa stosunkowo wysokie wskaźniki CS i EEA. Wskaźniki te były jednak istotnie niższe ( $P < 0,05$ ) dla obu rodzajów DMOM w porównaniu do mięsa wykrawanego ręcznie. Zawartość nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA) różniła ( $P < 0,05$ ) się istotnie zarówno w obu rodzajach DMOM, jak i w porównaniu do mięsa wykrawanego ręcznie. Podstawowym nasyconym kwasem tłuszczowym we wszystkich rodzajach mięsa był kw. palmitynowy (C 16:0), który stanowił ok. 70% ogólnej ilości tej grupy kwasów



tłuszczowych. Oznaczenia zawartości jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA) wykazały istotne różnice ( $P < 0.05$ ) w odniesieniu do DMOM, natomiast brak było takich różnic pomiędzy MOM gęsi a mięsem wykrawanym ręcznie. MOM kurcząt charakteryzowało się znacznie niższą zawartością MUFA ( $43.65\% \pm 0.36$  w tłuszczu badanego mięsa) w porównaniu do mięsa MOM gęsi ( $58.71\% \pm 1.14$  w tłuszczu badanego mięsa) ( $P < 0.05$ ). Głównym jednonienasyconym kwasem tłuszczowym we wszystkich rodzajach mięsa był kwas oleinowy (C 18:1), który stanowił ponad 90% ogólnej zawartości kwasów tłuszczowych monoenowych. Zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) różniła się istotnie ( $P < 0.05$ ) zarówno w odniesieniu do obu rodzajów DMOM, jak i w porównaniu do mięsa wykrawanego ręcznie. MOM kurcząt cechowało się ponad dwukrotnie wyższą zawartością PUFA ( $24.21\% \pm 0.38$  w tłuszczu badanego mięsa) w porównaniu do mięsa gęsi ( $11.21\% \pm 2.85$  w tłuszczu badanego mięsa). Najwyższy udział w grupie kwasów tłuszczowych wielonienasyconych miał kw. linolowy (C 18:2), który stanowił 93% ogólnej zawartości kwasów tłuszczowych polienowych w MOM kurcząt i 85% w MOM gęsi. Przeprowadzone badania wykazały zatem, że skład chemiczny i wartość odżywcza DMOM różni się zasadniczo od mięsa wykrawanego ręcznie. Drobiowe mięso odzyskane mechanicznie cechuje również znacznie niższa wartość odżywcza w porównaniu z mięsem wykrawanym ręcznie, a więc nadmierne użycie DMOM może prowadzić do obniżenia wartości odżywczej gotowego produktu. Wyniki przeprowadzonych badań opublikowano w artykułach:

- Bełkot Z., **Gondek M.** (2013). Nutritional value of fat of mechanically recovered chicken and geese meat. *Folia Vet.* 56 (Supl.), 10-13
- Bełkot Z., Ziomek M., **Gondek M.** (2013). Wartość odżywcza odzyskanego mechanicznie mięsa kurcząt i gęsi. *Med. Weter.* 69(8), 499-504.

### 7.5.3. Jakość mikrobiologiczna jaj spożywczych.

Jaja są jednym z najbardziej powszechnych produktów pochodzenia zwierzęcego zarówno w bezpośredniej konsumpcji, jak i przetwórstwie. Zgodnie z Rozporządzeniem (WE) 853/2004, za jaja konsumpcyjne uznaje się jaja w skorupkach, inne niż jaja inkubowane lub gotowane, wyprodukowane przez ptactwo hodowlane i nadające się do bezpośredniego spożycia przez ludzi lub do przyrządzania produktów jajecznych. Każde jajo wprowadzone do obrotu oznaczone jest kodem cyfrowym producenta, na który składają się następujące informacje: system chowu, symbol państwa oraz weterynaryjny numer identyfikacyjny. Pierwsza cyfra kodu jest informacją dla konsumenta, z jakiego systemu utrzymania kur niosek pochodzi dane jajo. Na podstawie Dyrektywy Komisji 2002/4/WE z 30 stycznia 2002 r., wyróżnić można cztery systemy utrzymania kur niosek: chów klatkowy (kod – 3), ściółkowy (kod – 2), wolnowybiegowy (kod – 1) i ekologiczny (kod – 0). Każdy z wymienionych systemów chowu jest odmienny pod względem czasu przebywania niosek w kurniku, podawania karmy, styczności ptaków z czynnikami zewnętrznymi środowiska, miejscem zniesienia jaj i odbioru jaj z kurnika. Optymalny system chowu powinien uwzględniać naturalne zachowania ptaków,

minimalizować prawdopodobieństwo występowania chorób zakaźnych i powstawania ran, a także korzystnie wpływać na produktywność i bezpieczeństwo żywności. Stąd celem prowadzonych przeze mnie badań było określenie obecności drobnoustrojów chorobotwórczych z rodzaju *Salmonella*, *Listeria*, *Campylobacter* i *Staphylococcus* na powierzchni jaj konsumpcyjnych w zależności od systemu utrzymania kur niosek. Materiał badawczy stanowiło 120 jaj, w tym 30 jaj z każdej z czterech ferm stosujących różne systemy chowu. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że na powierzchni jaj pochodzących z czterech badanych systemów utrzymania kur niosek nie stwierdzono obecności pałeczek z rodzaju *Salmonella*. Drobnoustroje z rodzaju *Campylobacter* stwierdzono na powierzchni 4 jaj (13,33%) pochodzących z chowu ściółkowego oraz 3 (10%) jaj z chowu wolnowybiegowego. Obecność *Listeria* spp. stwierdzono na 3 jajach (10%) pochodzących z chowu ściółkowego. W grupie tej obecność *L. monocytogenes* potwierdzono tylko w jednym przypadku. Spośród 30 badanych jaj pochodzących z chowu wolnowybiegowego bakterie z rodzaju *Listeria* wykazano na powierzchni 15 jaj, co stanowiło 50% wszystkich zbadanych, w tym *L. monocytogenes* obecna była na powierzchni 3 (10%) jaj. Podobnie kształtowało się zanieczyszczenie *Listeria* spp. jaj pochodzących z gospodarstwa ekologicznego, gdzie drobnoustroje te wyizolowano z powierzchni 14 (46,7%) jaj. Wszystkie badane jaja, niezależnie od systemu utrzymania kur niosek, były zanieczyszczone bakteriami z rodzaju *Staphylococcus*, ale tylko w jednej próbce pobranej z powierzchni jaja pochodzącego z chowu wolnowybiegowego wykazano obecność koagulazodatniego gatunku *Staph. hyicus subsp. hyicus*. Przeprowadzone badania wykazały, że na powierzchni jaj, niezależnie od systemu utrzymania kur niosek, mogą występować drobnoustroje chorobotwórcze dla ludzi. System chowu wpływa istotnie na stopień zanieczyszczenia powierzchni jaj tymi drobnoustrojami. Za najbardziej bezpieczny pod względem zanieczyszczenia jaj mikroflorą patogenną można uznać chów klatkowy, w którym stwierdzono jedynie obecność gronkowców koagulazoujemnych. Wyniki przeprowadzonych badań opublikowano w pracy:

- **Gondek M.**, Szkucik K., Bełkot Z. (2013). Wpływ różnych systemów utrzymania kur na zanieczyszczenie powierzchni jaj bakteriami chorobotwórczymi. *Med. Weter.* 69(6), 374-377.

Kolejnym etapem badań jaj konsumpcyjnych była ocena wpływu sposobu utrzymania kur niosek na ilościowe ich zanieczyszczenie mezofilnymi bakteriami tlenowymi, bakteriami proteolitycznymi, psychrotrofowymi, bakteriami z rodziny *Enterobacteriaceae*, bakteriami z rodzaju *Enterococcus* i *Staphylococcus*. Stwierdzono, że ogólna liczba bakterii tlenowych na ich powierzchni wynosiła od  $7,1 \times 10^4$  (log 4,85) do  $2,3 \times 10^5$  (log 5,35) jtk na  $\text{cm}^2$ . Najniższym zanieczyszczeniem cechowały się jaja z chowu klatkowego, nieco wyższym z chowu ekologicznego, a najwyższym z chowu ściółkowego i wolnowybiegowego. Liczba bakterii proteolitycznych na powierzchni badanych jaj wahała się od  $1,5 \times 10^4$  (log 4,18) do  $5,2 \times 10^4$  (log 4,72) jtk/ $\text{cm}^2$ . Bakterie tej grupy stanowiły największą część ogólnego zanieczyszczenia mikroflorą spośród wszystkich badanych grup

drobnoustrojów, a ich procentowy udział wynosił średnio 23,9%. Wykazano istotne różnice w zanieczyszczeniu powierzchni jaj bakteriami proteolitycznymi pomiędzy systemem klatkowym a ściółkowym i wolnowybiegowym ( $P < 0.05$ ). Zanieczyszczenie bakteriami psychrotrofowymi wahało się od  $3,66 \log \text{ jtk/cm}^2$  skorupy w systemie klatkowym do  $4,02 \log \text{ jtk/cm}^2$  w systemie ściółkowym. Istotne różnice w zanieczyszczeniu tą grupą bakterii wykazano tylko pomiędzy systemem klatkowym a ściółkowym ( $P < 0.05$ ). Zanieczyszczenie powierzchni jaj bakteriami z rodziny *Enterobacteriaceae* było niskie i wynosiło od kilku do kilkudziesięciu komórek w  $1 \text{ cm}^2$  skorupy jaja. Najniższe zanieczyszczenie tą grupą bakterii wystąpiło w systemie ściółkowym, a najwyższe w chowie wolnowybiegowym. *Enterobacteriaceae* stanowiły również marginalny poziom zanieczyszczenia ogólnego (od 0,01% do 0,02%), a istotne różnice w zanieczyszczeniu tą grupą bakterii zaznaczyły się pomiędzy systemem ściółkowym i wolnowybiegowym a dwoma pozostałymi badanymi systemami chowu ptaków ( $P < 0.05$ ), w których nie wykazano różnic ( $P > 0.05$ ). Zanieczyszczenie jaj bakteriami rodzaju *Enterococcus* było bardzo zróżnicowane. Z powierzchni jaj pochodzących z chowu klatkowego izolowano pojedyncze kolonie, a w pozostałych systemach liczba bakterii wahała się od  $1,23 \times 10^2$  ( $\log 2,08$ ) w przypadku jaj pochodzących z chowu ekologicznego do  $1,28 \times 10^3$  ( $\log 3,10$ )  $\text{jtk/cm}^2$  w przypadku chowu ściółkowego. Procentowy udział drobnoustrojów tej grupy w ogólnym zanieczyszczeniu był również niewielki i wynosił od 0,08% w chowie ekologicznym do 0,57% w chowie ściółkowym. Ponadto istotność różnic ( $P < 0.05$ ) w zanieczyszczeniu paciorkowcami kałowymi skorup jaj stwierdzono pomiędzy chowem klatkowym oraz ściółkowym a dwoma pozostałymi, pomiędzy którymi takie różnice nie wystąpiły. Podobnie jak w przypadku *Enterococcus* spp., najniższe zanieczyszczenie bakteriami z rodzaju *Staphylococcus* stwierdzono na skorupach jaj pochodzących z systemu klatkowego  $5,31 \times 10^2$  ( $\log 2,73$ ) najwyższe zaś z systemu wolnowybiegowego -  $2,30 \times 10^4$  ( $\log 4,36$ ) i ściółkowego -  $3,82 \times 10^4$  ( $\log 4,58$ )  $\text{jtk/cm}^2$ . Procentowy udział tej grupy drobnoustrojów w ogólnym zanieczyszczeniu wyniósł od 0,6% w systemie klatkowym do 17% w systemie ściółkowym, co wskazuje na istotny wpływ systemu utrzymania kur niosek na zanieczyszczenie gronkowcami, które pochodzą z zanieczyszczonej odchodami ściółki. Liczba drobnoustrojów z rodzaju *Staphylococcus* wykryta na powierzchni jaj pozyskanych z chowu ekologicznego była istotnie wyższa w porównaniu z jajami z chowu klatkowego, lecz niższa niż na powierzchni jaj pochodzących z chowu wolierowego i wolnowybiegowego ( $P < 0.05$ ). Jaja pozyskane z chowu ściółkowego i wolnowybiegowego nie wykazywały natomiast statystycznie istotnych różnic pod względem liczby izolowanych gronkowców ( $P > 0.05$ ). Przeprowadzone badania wykazały, że system utrzymania kur niosek ma istotny wpływ na zanieczyszczenie bakteryjne skorup jaj konsumpcyjnych. Najwyższą jakością higieniczną wykazują jaja z chowu klatkowego, najniższą zaś z chowu ściółkowego i wolnowybiegowego. Wyniki przeprowadzonych badań opublikowano w pracy:

- Bełkot Z., **Gondek M.** (2014). Zanieczyszczenie bakteryjne powierzchni jaj spożywczych w zależności od systemu utrzymania kur niosek. *Med. Weter.* 70(6), 378-382.

Ocena jakości mikrobiologicznej jaj przepiórczych stanowi kontynuację moich wcześniejszych badań dotyczących zanieczyszczenia mikrobiologicznego jaj spożywczych. W badaniach dokonałem oceny zmienności zanieczyszczenia mikrobiologicznego powierzchni jaj przepiórczych w zależności od częstotliwości przeprowadzanych zabiegów higienicznych na fermie takich jak: usuwanie odchodów (ferma nr 1: codziennie; ferma nr 2: 1-2 razy w tygodniu; ferma nr 3: 1 raz w tygodniu) oraz mycie i dezynfekcja klatek (co 6 miesięcy w fermie nr 1; 8-10 miesięcy w fermie nr 2 lub 12 miesięcy w fermie nr 3). Podczas analiz mikrobiologicznych oznaczono ogólną liczbę bakterii tlenowych, liczbę bakterii proteolitycznych, bakterii z rodzaju *Staphylococcus*, liczbę drobnoustrojów z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz liczbę drożdży i pleśni. W przeliczeniu na powierzchnię całego jaja oznaczono również obecność drobnoustrojów chorobotwórczych z rodzaju *Salmonella*, *Campylobacter* i *Listeria*. Ogólna liczba bakterii tlenowych na powierzchni badanych jaj wynosiła od  $1,8 \times 10^2$  (log 2,25) do  $3,0 \times 10^3$  (log 3,48) jtk na  $\text{cm}^2$ . Wykazano istotne różnice w zanieczyszczeniu bakteriami tlenowymi jaj pochodzących z trzech badanych hodowli. Najniższy poziom zanieczyszczenia stwierdzono w fermie, w której usuwanie odchodów przeprowadzano codziennie, a najwyższy w fermie gdzie odchody usuwano raz w tygodniu ( $P < 0.05$ ). Zanieczyszczenie bakteriami z rodziny *Enterobacteriaceae* było sporadyczne. Bakterie te izolowano tylko z jednej próbki z fermy nr 2 i z czterech próbek z fermy nr 3. Natomiast zanieczyszczenie bakteriami z rodzaju *Staphylococcus* było znaczne we wszystkich hodowlach. Liczba tych bakterii na powierzchni skorupy jaja wynosiła od  $9,4 \times 10$  (log 1,97) do  $7,1 \times 10^2$  (log 2,85) jtk/ $\text{cm}^2$ . Istotne różnice w poziomie zanieczyszczenia ( $P < 0.05$ ) tymi drobnoustrojami wystąpiły pomiędzy fermą nr 1 a pozostałymi dwiema hodowlami ( $P < 0.05$ ). Ze wszystkich badanych grup bakterii gronkowce stanowiły istotną część zanieczyszczenia mikrobiologicznego badanych jaj, a ich procentowy udział w ogólnym zanieczyszczeniu wynosił od 32,74% do 51,55%. Wśród tej grupy drobnoustrojów tylko w jednym przypadku, w fermie nr 1, potwierdzono występowanie gronkowca koagulazo-dodatniego i był to *Staphylococcus aureus subsp. anaerobius*. Zanieczyszczenie powierzchni jaj bakteriami proteolitycznymi wynosiło od  $5,5 \times 10$  (log 1,74) do  $3,4 \times 10^2$  (log 2,53) jtk/ $\text{cm}^2$ . Wykazano istotną różnicę w poziomie występowania tych drobnoustrojów pomiędzy jajami pochodzącymi z fermy nr 1 a jajami pochodzącymi z dwóch pozostałych hodowli ( $P < 0.05$ ). Procentowy udział drobnoustrojów o właściwościach proteolitycznych w ogólnym zanieczyszczeniu wahał się od 10,46% w fermie nr 3 do 36,87% w fermie nr 1. Nie stwierdzono obecności grzybów (pleśni i drożdży) na powierzchni jaj pobranych z fermy 1, natomiast ich liczba na powierzchni jaj pobranych z pozostałych ferm nie różniła się istotnie i wynosiła od  $0,94 \times 10$  (log 0,97) do  $3,1 \times 10$  (log 1,49) jtk/ $\text{cm}^2$  ( $P > 0.05$ ). Spośród wszystkich badanych jaj w dwóch przypadkach wykazano obecność drobnoustrojów z rodzaju *Listeria*. Bakterie te izolowano z próbek pochodzących z ferm nr 2 oraz 3. Badanie techniką PCR nie potwierdziło przynależności tych bakterii do gatunku *L. monocytogenes*. Na powierzchni jaj pobranych ze wszystkich trzech badanych ferm nie wykazano również obecności bakterii z rodzaju *Campylobacter* oraz *Salmonella*. Przeprowadzone badania wykazały, że częstotliwość wykonywania zabiegów higienicznych w hodowlach przepiórek ma istotny wpływ na poziom

zanieczyszczenia mikrobiologicznego powierzchni jaj pozyskiwanych od tych ptaków. Największy udział w zanieczyszczeniu ogólnym powierzchni jaj przepiórczych stanowią bakterie z rodzaju *Staphylococcus*. Ze względu na brak występowania na powierzchni badanych jaj bakterii chorobotwórczych z rodzajów *Campylobacter* i *Salmonella* oraz *L. monocytogenes*, a także niskie ogólne zanieczyszczenie mikrobiologiczne można uznać, że jaja przepiórcze są bezpieczne dla konsumentów, pod warunkiem przestrzegania wymogów sanitarnych w fermach. Wyniki przeprowadzonych badań opublikowano w pracy:

- Drozd Ł., **Gondek M.**, Szkucik K., Knaga S., Ziomek M. (2015). Zanieczyszczenie mikrobiologiczne powierzchni jaj przepiórczych. *Med. Weter.* 71(5), 303-306.

#### 7.5.4. Zawartość ubichinonu Q10 i białka w mięsie królików w zależności od rodzaju mięśnia i systemu hodowli zwierząt.

Ubichinon Q10 (CoQ10) to związek zawierający pierścień chinonowy połączony ze złożonym z 10 jednostek izoprenowych łańcuchem bocznym. CoQ10 odgrywa istotną rolę w ludzkim organizmie: przyczynia się do syntezy ATP, wspomaga aktywność termogeniczną, stabilizuje błony komórkowe, zapobiega dysfunkcji śródbłonna oraz wykazuje działanie przeciwutleniające. Tkankowy CoQ10 pochodzi z syntezy endogennej, pożywienia lub jest dostępny jako suplement diety. Jego dystrybucja w poszczególnych narządach i tkankach jest zróżnicowana; u ludzi najwyższy poziom ubichinonu odnotowuje się w najbardziej aktywnych metabolicznie narządach takich jak serce, wątroba oraz nerki. Koenzym Q10 występuje naturalnie w większości produktów spożywczych, ale w różnych ilościach. Zawartość ubichinonu w tkance mięśniowej zwierząt rzeźnych z kolei zależy od gatunku, płci oraz rodzaju mięśnia. Mięso królicze uznawane jest za dobre źródło łatwo dostępnego, wysokiej jakości białka, lecz w dostępnej literaturze brak jest informacji na temat zawartości w nim CoQ10. Stąd, w badaniach w których uczestniczyłem, dokonano oceny poziomu ubichinonu Q10 i zawartości białka w tkance mięśniowej królików z uwzględnieniem rodzaju mięśnia i sposobu hodowli zwierząt. Materiał badawczy stanowiło 96 tusz królików rzeźnych. Połowa z nich pochodziła od zwierząt hodowanych w małych przydomowych gospodarstwach rolnych, w których zwierzęta karmione były paszą przygotowaną z naturalnych składników, podczas gdy druga połowa pochodziła z dużych ferm i karmiona była gotowymi paszami komercyjnymi. Poziom CoQ10 oraz białka oznaczono w mięśniach ud i grzbietu. Przeprowadzone badania wykazały, że poziom ubichinonu Q10 w tkance mięśniowej królików wahał się od 76 do 127  $\mu\text{g/g}$  tkanki. Ponadto wykazano, że system chowu królików i typ mięśni wpływały na zawartości CoQ10. Mięso królików utrzymywanych w tradycyjnym systemie chowu przydomowego wykazywało bowiem statystycznie istotnie wyższe stężenie CoQ10 w porównaniu do tkanki mięśniowej królików pochodzących z hodowli komercyjnej ( $P \leq 0.01$ ). Ponadto poziom CoQ10 w mięśniach grzbietu był wyższy niż w mięśniach ud ( $P \leq 0.01$ ); zależności takie odnotowano w obydwu systemach hodowli zwierząt. Współczynnik korelacji między zawartością ubichinonu a białka w

mięśniach badanych królików wyniósł 0.94. Badania wykazały również wyższy poziom białka w mięśniach grzbietu w porównaniu do mięśni udowych ( $P \leq 0.01$ ). System chowu nie wpływał natomiast istotnie na zawartość białka w tkance mięśniowej królików. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że mięso królików, zwłaszcza pochodzące z przydomowej hodowli tradycyjnej (ekologicznej), stanowi dobre źródło koenzymu Q10 w diecie człowieka. Wyniki badań nad zawartością CoQ10 i białka w mięśniach królików przedstawiono w publikacji:

- Szkucik K., Pyz-Łukasik R., Wójcik M., **Gondek M.** (2013). Ubiquinone Q10 and protein contents in rabbit meat in relation to primal cut and rearing system. Bull. Vet. Inst. Pulawy 57, 107-111.

#### 7.5.5. Zawartość selenu w mięśniach i narządach wewnętrznych koni rzeźnych.

Selen jest mikroelementem niezbędnym do funkcjonowania organizmów żywych. Źródłem selenu są zarówno produkty pochodzenia roślinnego jak i zwierzęcego. Selen w formie nieorganicznej, czyli selenianów (IV) lub (VI), jest wchłaniany przez rośliny z gleby, następnie przekształcany do form organicznych, głównie do selenometioniny oraz selenocysteiny. Ta druga forma dominuje w produktach pochodzenia zwierzęcego. W tej postaci selen jest również spożywany przez ludzi. Zawartość selenu w organizmach zwierzęcych jest zróżnicowana i wynosi od setnych części do kilku mg/kg danej tkanki. Najwięcej selenu gromadzi się w warstwie korowej nerek, trzustce, przysadce i wątrobie, również w sierści, piórach i rogach. Celem kolejnych badań, w których uczestniczyłem, było oznaczenie zawartości selenu w wybranych tkankach koni rzeźnych i określenie jego zmienności w zależności od wieku oraz płci. W badaniach uwzględniono trzy mięśnie szkieletowe (*m. longissimus pars thoracis*, *m. supraspinatus*, *m. semimembranosus*) oraz narządy wewnętrzne, które zaliczane są do ubocznych surowców jadalnych takie jak płuca, wątroba i nerki. Wykazano statystycznie istotne ( $P \leq 0.01$ ) różnice zawartości selenu pomiędzy wszystkimi badanymi tkankami. Najwięcej selenu stwierdzono w nerkach (0.487 ppm), istotnie mniejszą ( $P \leq 0.01$ ) zawartość tego pierwiastka oznaczono w wątrobie (0.177 ppm), a jeszcze mniejszą – w płucach (0.062 ppm). Najmniej badanego pierwiastka było w tkance mięśniowej (0.039 ppm). Uwzględniając wiek koni, w nerkach i mięśniach zwierząt młodych wykazano statystycznie większą ( $P \leq 0.01$ ) zawartość selenu w porównaniu do zwierząt starych. Płeć miała niewielki wpływ na zawartość selenu zarówno w narządach wewnętrznych, jak i w mięśniach badanych koni, a istotne ( $P \leq 0.01$ ) różnice dotyczyły jedynie nerek. Z trzech badanych mięśni najwięcej selenu oznaczono w mięśniu nadgrzebieniowym (*m. supraspinatus*), a nieznacznie mniej, ale w wymiarze statystycznie istotnym ( $P \leq 0.01$ ) w mięśniach najdłuższym (*m. longissimus pars thoracis*) i półbłoniastym (*m. semimembranosus*). Różnice te dotyczyły jednak jedynie mięśni zwierząt młodych. Najmniej selenu zawierały mięśnie zwierząt powyżej dziesiątego roku życia. W tej grupie zwierząt nie wykazano istotnych ( $P \leq 0.01$ ) różnic pomiędzy badanymi mięśniami, a także nie wykazano istotnego wpływu płci. Przeprowadzone badania wykazały, że w tkankach koni rzeźnych wstępuje zróżnicowana

zawartość selenu zarówno w narządach wewnętrznych jak i poszczególnych mięśniach. Najwyższy poziom selenu występuje w nerkach młodych klaczy. Natomiast w mięśniach młodych samców stwierdzono większą zawartość selenu w porównaniu z mięśniami samic. Wyniki przeprowadzonych badań opublikowano w pracy:

- Szkucik K., **Gondek M.**, Bełkot Z., Kurska K. (2014). Zawartość selenu w mięśniach i narządach wewnętrznych koni rzeźnych w zależności od ich wieku i płci. *Żywn. Nauka Technol. Jakość* 5 (96), 63-71.

#### 7.5.6. Wpływ ekstraktów z nasion grejpfruta i tarczycy bajkalskiej na skład chemiczny i cechy sensoryczne mięsa indyczego.

Odkąd zakazano stosowania antybiotykowych stymulatorów wzrostu i wzrosło zapotrzebowanie konsumentów na tzw. „zdrową żywność”, w praktyce weterynaryjnej, zioła i ekstrakty roślinne coraz częściej włączane są do diety zwierząt w celach terapeutycznych i profilaktycznych. Udowodniono, że Citrosept, czyli ekstrakt z pestek grejpfruta, wykazuje właściwości przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze i przeciwwirusowe. Polecany jest również do stosowania profilaktycznego jako bogaty we flawonoidy suplement diety. Suszony korzeń *Scutellaria baicalensis* Georgi (*Labiatae*) z kolei charakteryzuje się działaniem przeciwbakteryjnym i przeciwzapalnym. Wykazuje również właściwości przeciwwirusowe, przeciwnowotworowe, antyoksydacyjne i hepatoprotekcyjne. Celem kolejnych badań, w których uczestniczyłem, było określenie wpływu preparatu Citrosept (ekstrakt z nasion grejpfruta) i ekstraktu z korzenia tarczycy bajkalskiej na skład chemiczny tkanki mięśniowej oraz wybrane cechy sensoryczne mięsa indyczego oraz ustalenie optymalnej dawki stosowanych preparatów w żywieniu indyków rzeźnych. Indyki podzielono na grupę kontrolną (K) oraz 6 grup doświadczalnych (C1, C2, C3; B1, B2 i B3), w których zastosowano dodawane do wody pitnej różne dawki badanych preparatów (Citrosept w dawkach 0.011, 0.021 i 0.042 ml/kg<sup>-1</sup> m.c. i ekstrakt z tarczycy bajkalskiej w dawkach 0.009, 0.018 i 0.036 ml/kg<sup>-1</sup> m.c.) W badaniach wykazaliśmy, że żaden z ocenianych ekstraktów stosowany w niskich i umiarkowanych dawkach nie wpłynął istotnie ( $P > 0.05$ ) na cechy sensoryczne mięsa indyków oraz na zawartość w nim suchej masy, popiołu surowego i białka. Wykazano jedynie, że najwyższe dawki ekstraktu z nasion grejpfruta i tarczycy bajkalskiej spowodowały statystycznie istotny wzrost ( $P < 0.05$ ) popiołu surowego w mięśniach piersiowych indyków oraz wpłynęły niekorzystnie na ich atrakcyjność sensoryczną. Wyniki przeprowadzonych badań opublikowano w pracy:

- Rusinek-Prystupa E., Szkucik K., Pisarski R.K., **Gondek M.** (2014). Effect of extract of grapefruit seeds and Baikal scullcap root on chemical composition and sensory traits of female turkey meat. *Electron. J. Pol. Agric. Univ.* 17, 1.

### 7.5.7. Jakość zdrowotna jadalnych produktów pozyskiwanych ze ślimaków w Polsce.

Szybko rozwijający się sektor produkcji żywności na świecie sprzyja wprowadzaniu na rynek nowych rodzajów żywności. Pojawienie się nowych produktów spożywczych jest wynikiem poszukiwania alternatywnych dla mięsa zwierząt rzeźnych źródeł białka pochodzenia zwierzęcego oraz dążenia do zaspokojenia coraz bardziej wyrafinowanych gustów konsumentów. Jadalne mięso ślimaków spełnia obydwie te wymagania. Obecnie najczęściej spożywane gatunki ślimaków na świecie należą do rodzin *Achatinidae* i *Helicidae*. W Polsce mięso pozyskiwane jest z trzech gatunków ślimaków: ślimaka winniczka (*Helix pomatia*), ślimaka małego szarego (*Cornu aspersum aspersum*, wcześniej *Helix aspersa* Müller) oraz ślimaka dużego szarego (*Cornu aspersum maxima*, wcześniej *Helix aspersum maxima*). Ślimaki z rodzaju *Cornu* pozyskiwane są z hodowli fermowych, natomiast winniczek pochodzi ze środowiska naturalnego, a jego zbiór jest ściśle regulowany przepisami prawa krajowego. Od początku pracy w Katedrze Higieny Żywności Zwierzęcego Pochodzenia aktywnie uczestniczę w kompleksowych badaniach nad wartością odżywczą oraz jakością mikrobiologiczną mięsa ślimaków pozyskiwanych na obszarze Polski.

W badaniach nad składem chemicznym mięsa ślimaków, w których uczestniczyłem, dokonano oceny zawartości kwasów tłuszczowych w jadalnym tłuszczu ślimaków w zależności od gatunku, pochodzenia oraz etapu ich przetwarzania. Wykazano, że tłuszcz *Helix pomatia* charakteryzuje się wyższą zawartością nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA), podczas gdy tłuszcz ślimaków z rodzaju *Cornu* wykazuje wyższą zawartość jedno- i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) ( $P < 0.05$ ). Udowodniono ponadto, że obróbka termiczna mięsa ślimaków powoduje wzrost nasyconych kwasów tłuszczowych, kwasów oleinowego, eikozenowego i erukowego a także spadek poziomu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Miejsce pochodzenia ślimaków nie wpływa natomiast istotnie na profil kwasów tłuszczowych w ich mięsie, a zaobserwowane różnice stwierdzono jedynie pomiędzy gatunkami ślimaków z rodzaju *Cornu* i dotyczyły one kwasu oleinowego, linolowego i eikozapentaenowego. Wyniki badań opublikowano w artykule:

- Szkucik K., Ziomek M., Paszkiewicz W, Drozd Ł., **Gondek M.**, Knysz P. (2018). Fatty acid profile in fat obtained from edible part of land snails harvested in Poland. *J. Vet. Res.* 62(4), 519-526.

W kolejnej pracy dokonano oceny poziomu miedzi, selenu i cynku w mięsie trzech gatunków ślimaków (*Helix pomatia*, *Cornu aspersum maxima* i *Cornu aspersum aspersum*) pozyskiwanych w Polsce oraz zbadano wpływ wstępnej obróbki ślimaków z gatunku *Helix pomatia* (tj. zaparzenie, wytrzewianie, gotowanie i mrożenie) na zawartość w/w pierwiastków w jadalnej ich części. Wykazano, że zawartość selenu różniła się istotnie pomiędzy wszystkimi trzema gatunkami badanych ślimaków (najwyższa w tkankach pozyskanych od *Cornu aspersum aspersum* –  $0.19 \pm 0.03$  mg/kg, najniższa w tkankach pozyskanych od *Helix pomatia* –  $0.09 \pm 0.05$  mg/kg). Koncentracja miedzi w mięsie



pozyskanym od ślimaków winniczków ( $14.8 \pm 10.1$  mg/kg) była istotnie wyższa w porównaniu do hodowlanych ślimaków z rodzaju *Cornu* ( $3.99 \pm 2.48 - 6.22 \pm 1.85$  mg/kg) ( $P < 0.05$ ). W badaniach nie stwierdzono natomiast istotnej różnicy w poziomie cynku pomiędzy trzema gatunkami ślimaków ( $19.81 \pm 5.14 - 20.93 \pm 3.42$  mg/kg). Wykazano również wpływ pochodzenia ślimaków (region Polski) na koncentracje badanych pierwiastków. Zawartość selenu w surowym i przetworzonym mięsie winniczków nie wykazywała istotnych różnic, natomiast zawartość miedzi i cynku była istotnie wyższa ( $P < 0.05$ ) w próbkach mięsa przetworzonego. Wyniki badań udowodniły, że koncentracja selenu, miedzi i cynku w mięsie ślimaków zależy od gatunku, miejsca ich hodowli oraz obróbki wstępnej na którą składają się takie etapy jak zaparzenie, wytrzewianie, gotowanie i mrożenie. Wyniki badań przedstawiono w publikacji:

- Drozd Ł., Ziomek M., Szkucik K., Paszkiewicz W., Maćkowiak-Dryka M., Bełkot Z, **Gondek M.** (2017). Selenium, copper, and zinc concentrations in the raw and processed meat of edible land snails harvested in Poland. J. Vet. Res. 61(3), 293-298.

W dostępnej literaturze przedmiotu brak jest również danych dotyczących zawartości witaminy C w jadalnych tkankach ślimaków, stąd celem kolejnego doświadczenia wchodzącego w skład cyklu tematycznego dotyczącego wartości odżywczej mięsa ślimaków było oznaczenie i porównanie zawartości kwasu askorbinowego w mięsie pozyskanych w Polsce ślimaków należących do trzech jadalnych gatunków: *Helix pomatia*, *Cornu aspersum aspersum* i *Cornu aspersum maxima*. W badaniach tych wykazano, że średni poziom witaminy C w jadalnej części poszczególnych gatunków ślimaków wahał się od  $38,14 \pm 4,43$  mg/kg (*Helix pomatia*) do  $185,38 \pm 40,82$  mg/kg (*Cornu aspersum aspersum*). Jednocześnie wykazano istotne różnice w zawartości kwasu askorbinowego pomiędzy wszystkimi badanymi gatunkami ślimaków ( $P < 0.05$ ). Najwyższą zawartość witaminy C stwierdzono w mięsie ślimaków z gatunku *Cornu aspersum aspersum*. Poziom witaminy C w mięsie ślimaków z gatunku *Cornu aspersum maxima* był istotnie niższy ( $P < 0.05$ ) w porównaniu do jej zawartości w mięsie *Cornu aspersum aspersum*, ale istotnie wyższy ( $P < 0.05$ ) niż w mięsie *Helix pomatia*. Najniższą zawartość kwasu askorbinowego stwierdzono natomiast w mięsie winniczków; była ona, odpowiednio, 4,9 i 2,7-krotnie niższa niż w mięsie ślimaków z gatunku *Cornu aspersum aspersum* oraz *Cornu aspersum maxima*. Przeprowadzone badania wykazały, że gatunek ślimaków pozyskiwanych w Polsce ma istotny wpływ na poziom witaminy C w ich mięsie. Znacznie wyższa zawartość kwasu askorbinowego występuje w utrzymywanych w helikulturach ślimakach z rodzaju *Cornu* w porównaniu do wolno żyjącego winniczka (*Helix pomatia*). Ponadto zawartość kwasu askorbinowego w jadalnej części ślimaków z gatunku *Cornu aspersum aspersum* jest wyższa w porównaniu do jego zawartości w mięsie wieprzowym oraz wołowym. Udowodniono, że spożywanie ślimaków z rodzaju *Cornu* może stanowić zatem dodatkowe źródło witaminy C w diecie człowieka. Wyniki badań opublikowano w artykule:

- **Gondek M.**, Knysz P., Lechowski J., Ziomek M., Drozd Ł., Szkucik K. (2020). Zawartość witaminy C w jadalnych tkankach ślimaków pozyskiwanych w Polsce. *Med. Weter.* 76(10) , 580-584.

Ślimaki z gatunku *Helix pomatia* (winniczek) pozyskiwane są ze środowiska naturalnego, co stwarza ryzyko występowania w ich tkankach toksycznych pozostałości chemicznych takich jak metale ciężkie. Akumulacja metali ciężkich, które mogą przenosić się na wyższe poziomy troficzne, ma istotne znaczenie w lądowym łańcuchu pokarmowym i stanowi zagrożenie dla zdrowia ludzkiego ze względu na ich toksyczność. Przekroczenie bezpiecznych granic narażenia człowieka na kadm (Cd) i ołów (Pb) może skutkować akumulowaniem tych metali w tkankach, zaburzeniami rozrodu, zaburzeniami w funkcjonowaniu układu nerwowego i hormonalnego, zmianami w DNA. Metale te wykazują również działanie mutagenne i kancerogenne, jak również przyczyniają się do hamowania syntezy białek i aktywności wielu enzymów. Rozporządzenie (WE) 1881/2006 ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych nie określa limitów pozostałości Cd i Pb w mięsie lądowych ślimaków jadalnych. Stąd celem kolejnych badań, w których uczestniczyłem, było określenie i porównanie zawartości Cd i Pb w mięsie ślimaków winniczków pozyskanych z siedmiu różnych województw Polski. Ponadto oceniono wpływ wstępnej obróbki technologicznej mięsa ślimaków na koncentrację tych pierwiastków w badanych tkankach. Badania wykazały, że zawartość kadmu w próbkach mięsa surowego wahała się od 0.06 mg kg<sup>-1</sup> do 0.22 mg kg<sup>-1</sup>, a ołowiu od 0.06 mg kg<sup>-1</sup> do 0.18 mg kg<sup>-1</sup>. Przeprowadzone analizy wykazały również wzrost zawartości kadmu z 0.12 mg kg<sup>-1</sup> do 0.18 mg kg<sup>-1</sup> w mięsie ślimaków poddanych obróbce termicznej oraz brak zmian w koncentracji ołowiu podczas dwuetapowej obróbki cieplnej. Wyniki badań potwierdziły, że ślimaki lądowe z gatunku *Helix pomatia* mogą akumulować ołów i kadm, a proces gotowania powoduje zwiększenie zawartości Cd w jadanej ich części. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w artykule:

- Ziomek M., Drozd Ł., Chałabis-Mazurek A., Szkucik K., Paszkiewicz W., Valverde Piedra J.L., Bełkot Z., Maćkowiak-Dryka M., **Gondek M.**, Knysz P. (2018). Concentration levels of cadmium and lead in the raw and processed meat of *Helix pomatia* snails. *Pol. J. Vet. Sci.* 21(3), 483-489.

Rozporządzenie Komisji (WE) nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych nie zawiera wymagań mikrobiologicznych dla surowych jadalnych tkanek (mięsa) ślimaków lądowych. Kryteria tam zawarte odnoszą się jedynie do półproduktu, jakim jest mięso gotowane (brak *Salmonella* w 25 g) oraz żywności gotowej do spożycia (RTE) wytworzonej z udziałem takiego mięsa (brak w 25 g lub nie więcej niż 100 jtk/g *Listeria monocytogenes*). W Polsce nie były również podejmowane kompleksowe badania mikrobiologiczne pozyskiwanego mięsa ślimaków, stąd celem badań, w których brałem udział było określenie

występowania drobnoustrojów z rodzajów *Salmonella* oraz *Listeria* w mięsie wolno żyjących i hodowlanych ślimaków jadalnych. Przeprowadzone badania wykazały brak obecności *Salmonella* spp. w próbkach surowego oraz mrożonego mięsa pozyskanego zarówno z winniczków jak i ślimaków z rodzaju *Cornu*. Bakterie z rodzaju *Listeria* występowały w 42.1% przebadanych próbek mięsa ślimaków. Szczególnie wysoki stopień zanieczyszczenia tą mikrobiotą dotyczył surowego mięsa ślimaków; w zależności od gatunku i regionu (gospodarstwa) bakteriami tymi zanieczyszczonych było od 60% do nawet 75% próbek. *L. monocytogenes* została wykryta natomiast w 2.1% ogółu przebadanych próbek, a wyizolowane szczepy pochodziły wyłącznie z surowego mięsa hodowlanych ślimaków *Cornu aspersum aspersum* i *Cornu aspersum maxima*. Przeprowadzone badania wykazały, że podejmowanie skutecznych środków eliminacji patogenów na kolejnych etapach łańcucha produkcyjnego, takich jak obróbka termiczna surowego mięsa oraz przestrzeganie reżimu sanitarnego przy konfekcjonowaniu mięsa po obróbce termicznej zapewnia znaczną ich redukcję, a nawet eliminację z produktu finalnego, którym jest mrożone, gotowane mięso ślimaków. Wyniki badań opublikowano w artykule:

- Paszkiewicz W., Szkucik K., Ziomek M., **Gondek M.**, Pyz-Łukasik R. (2018). Występowanie drobnoustrojów rodzajów *Salmonella* i *Listeria* w mięsie ślimaków jadalnych. Med. Weter. 74(2), 110-113.

Wiele składników pokarmowych spożywanych w diecie może mieć pozytywny lub negatywny wpływ na rozwój i stan tkanki kostnej. Składniki te mogą poprzez różnego rodzaju mechanizmy wpływać na modyfikację makro- i mikrostruktury kości, tempo ich metabolizmu, funkcjonowanie układu hormonalnego, a także równowagę składników mineralnych odgrywających istotną rolę w rozwoju kośćca (wapń, potas i magnez). Celem kolejnej pracy dotyczącej wartości odżywczej mięsa ślimaków było określenie wpływu, na stan układu kostnego szczurów rasy Wistar, diety zawierającej, jako jedyne źródło białka, mięso trzech różnych gatunków ślimaków (*Helix pomatia*, *Cornu aspersum aspersum* i *Cornu aspersum maxima*). Ze względu na wysoką korelację pomiędzy gęstością mineralną (BMD) szyjki kości udowej oraz odcinka lędźwiowego kręgosłupa a stanem żuchwy u zwierząt z doświadczalnie wywołaną osteopenią badaniom densytometrycznym, morfometrycznym i tomograficznym poddano żuchwy wyizolowane od badanych szczurów. Wyniki badań wykazały, że mięso wszystkich trzech gatunków ślimaków jako jedyne źródło białka w eksperymentalnej diecie szczurów istotnie obniżyło zawartość mineralną tkanki kostnej (BMC) oraz gęstość mineralną kości żuchwy (BMD). Ponadto zaobserwowano statystycznie istotne ( $P < 0.05$ ) obniżenie parametrów tomograficznych dotyczących tkanki kostnej zbitej oraz gąbczastej. Wykorzystując metodę trójpunktowego testu ugięcia wykazano także spadek wytrzymałości żuchwy na działanie obciążeń w zakresie siły maksymalnej w grupach szczurów otrzymujących dietę opartą o mięso ślimaków w porównaniu z kontrolną grupą żywioną kazeiną. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że dieta

oparta jedynie o białko, którego źródłem jest mięso ślimaków może mieć negatywny wpływ na układ kostny organizmu. Wyniki badań opublikowano w pracy:

- Bieńko M., Radzki R.P., Wolski D., Dębiak P., Szkucik K., Ziomek M., **Gondek M.** (2018). Influence of snail meat in the diet on mandibular bone loss in male rats: a densitometric, tomographic and morphometric study. *Med. Weter.* 74(11), 713-718.

Jajeczka ślimaków szarych przeznacza się do wylęgu oraz do produkcji substytutu kawioru potocznie nazywanego białym kawior. Solone jajeczka stanowią alternatywę dla kawioru i ze względu na ich ograniczoną produkcję, wartość odżywczą, właściwości sensoryczne oraz stosunkowo wysoką cenę, uważane są za ekskluzywny przysmak. Zróżnicowane bakteryjne choroby ślimaków mogą być przyczyną mikrobiologicznego zanieczyszczenia jajeczek, mogą również wpływać na ich przydatność spożywczą oraz na bezpieczeństwo zdrowotne tego produktu dla konsumenta. W dostępnej literaturze brak jest danych dotyczących jakości mikrobiologicznej substytutu kawioru wytwarzanego z jajeczek pozyskiwanych od ślimaka szarego. Stąd w kolejnych badaniach dotyczących jakości mikrobiologicznej produktów pozyskiwanych ze ślimaków hodowanych w Polsce dokonano oceny występowania drobnoustrojów z rodzajów *Salmonella* i *Listeria* oraz określono liczbę gronkowców w pozyskanych od ślimaków z gatunku *Cornu aspersum aspersum* i *Cornu aspersum maxima*: (1) surowych jajeczkach (pobrane bezpośrednio po złożeniu przez ślimaki do kubków lęgowych wypełnionych ziemią); (2) półprodukcie (otrzymanym po wstępnej obróbce technologicznej polegającej na ręcznej segregacji jajeczek i ich wielokrotnym przemywaniu wodą) oraz (3) produkcie finalnym (substytut kawioru) otrzymanym przez umieszczenie jajeczek w roztworze NaCl, a następnie zapakowanie ich w szklane słoiki. W przeprowadzonych badaniach nie stwierdzono obecności *Salmonella* spp. oraz gronkowców koagulazododatnich w surowcu, półprodukcie jak również produkcie gotowym pozyskanym od dwóch podgatunków ślimaka szarego. Bakterie z rodzaju *Listeria* znaleziono w próbkach pobranych na każdym etapie produkcji; jednak obecność *L. monocytogenes* potwierdzono jedynie w próbkach produktu finalnego. Brak obecności bakterii z rodzaju *Salmonella* oraz koagulazododatnich gronkowców może świadczyć o prawidłowych warunkach higienicznych panujących zarówno podczas hodowli ślimaków z rodzaju *Cornu* jak również podczas zbioru i przetwarzania ich jajeczek. Występowanie *Listeria monocytogenes* w produkcie gotowym może jednak stanowić zagrożenie dla zdrowia konsumenta. Wyniki badań opublikowano w pracy:

- Maćkowiak-Dryka M., **Gondek M.**, Szkucik K. (2021). Occurrence of selected pathogenic microorganisms in raw and processed eggs of snails of the *Cornu* genus. *J. Vet. Res.* 65(4), 463-467.

7.5.8. Wartość odżywcza i jakość mikrobiologiczna serów wyprodukowanych metodami tradycyjnymi w Polsce.

Żywność tradycyjna i regionalna cieszy się wzrastającym zainteresowaniem konsumentów. Jak wykazały badania sondażowe przeprowadzone w Polsce i na świecie, żywność taka postrzegana jest przede wszystkim jako zdrowa, smaczna, oryginalna, wytwarzana według domowej receptury oraz mniej przetworzona.

Polskie tradycyjne sery wytwarzane są najczęściej w małych gospodarstwach rodzinnych, zgodnie z wieloletnią recepturą, niejednokrotnie specyficzną dla danego regionu. Uproszczony proces produkcji regionalnych serów tradycyjnych, wykluczający zastosowanie zaawansowanych rozwiązań technologicznych oraz norm produkcyjnych powoduje, iż wyroby te, pochodzące od różnych producentów, mogą charakteryzować się dużym zróżnicowaniem w zakresie cech jakościowych oraz składu chemicznego. Celem przeprowadzonych badań, w których brałem udział, było określenie składu chemicznego i wartości odżywczej regionalnych serów podpuszczkowych krótko dojrzewających wędzonych i niewędzonych oraz serów niewędzonych długo dojrzewających, wyprodukowanych metodami tradycyjnymi z mleka krowiego. Oznaczenia zawartości wody wykazały istotne różnice w jej poziomie pomiędzy wędzonymi serami krótko dojrzewającymi i serami niewędzonymi długo dojrzewającymi. Sery niewędzone długo dojrzewające zawierały bowiem istotnie mniej wody ( $32.2\% \pm 7.18$ ) ( $P < 0.05$ ) w porównaniu do pozostałych dwóch rodzajów serów krótko dojrzewających. Średnia zawartość tłuszczu wynosiła od  $22.2\% \pm 6.95$  w serach wędzonych krótko dojrzewających do  $24\% \pm 11.56$  w serach długo dojrzewających niewędzonych. Nie stwierdzono jednak istotnych różnic w zawartości tłuszczu pomiędzy badanymi trzema rodzajami serów. Z kolei średnia zawartość białka w analizowanych produktach wynosiła od  $25.6\% \pm 1.19$  do  $31.6\% \pm 1.45$ , przy czym istotnie najwyższą jego zawartość stwierdzono w serach niewędzonych długo dojrzewających. Średnia procentowa zawartość soli w analizowanych produktach była wysoka i wahała się od  $3.9\% \pm 1.95$  w serach niewędzonych długo dojrzewających do  $7.7\% \pm 1.53$  w serach niewędzonych krótko dojrzewających. Jednocześnie sery niewędzone krótko dojrzewające charakteryzowały się istotnie najwyższą zawartością ( $P < 0.05$ ) soli w porównaniu do pozostałych dwóch rodzajów badanych produktów. Oceniane sery nie różniły się istotnie pod względem zawartości popiołu całkowitego, którego najniższy poziom stwierdzono w serach wędzonych krótko dojrzewających. We wszystkich trzech rodzajach badanych serów sumaryczna zawartość aminokwasów egzogennych była porównywalna i wahała się od 46.47 g do 47.36 g/100 g białka, zaś aminokwasów endogennych w granicach 52-53 g/100 g białka. Spośród analizowanych aminokwasów endogennych jedyne stwierdzone statystycznie różnice dotyczyły proliny, której najwyższą zawartość stwierdzono w serach niewędzonych długo dojrzewających oraz seryny i kwasu asparaginowego, których poziom różnił się statystycznie istotnie tylko pomiędzy serami krótko i długo dojrzewającymi niepoddanymi procesowi wędzenia ( $P < 0.05$ ). Pomędzy trzema rodzajami badanych serów nie wykazano istotnych różnic w poziomie aminokwasów egzogennych, takich jak: histydyna, izoleucyna, leucyna, lizyna, treonina, walina oraz w poziomie aminokwasów aromatycznych obejmujących fenyloalaninę oraz tyrozynę. Odnosząc wyniki przeprowadzonych badań do wzorca białka jaja kurzego stwierdzono, że aminokwasami

ograniczającymi dla wszystkich rodzajów sera były metionina i cysteina. Natomiast porównując do wzorca FAO/WHO z 1991 r. dla wszystkich grup wiekowych powyżej 1 roku życia wykazano, iż dla serów krótko dojrzewających wędzonych i niewędzonych aminokwasami ograniczającymi były aminokwasy siarkowe: metionina i cysteina, natomiast w przypadku serów długo dojrzewających – treonina. Jednocześnie wskaźnik CS wyliczony dla tych aminokwasów w oparciu o wzorzec białkowy FAO osiągnął wysoką wartość wynoszącą, w zależności od rodzaju badanego sera, od 92.65% do 102.40%, średnia zaś wartość zintegrowanego wskaźnika aminokwasów egzogennych (EAAI) dla wszystkich, trzech badanych rodzajów serów wynosiła 137.43%. Przeprowadzone badania stanowią pierwszą próbę kompleksowej oceny składu podstawowego oraz profilu aminokwasowego regionalnych serów tradycyjnych produkowanych z mleka krowiego na obszarze Polski południowo-wschodniej. Wykazano, że skład chemiczny serów tradycyjnych charakteryzuje zmienność, która uwarunkowana może być różnicami w wyjściowym składzie surowca użytego do ich wytwarzania, jak również różnicami w samej technologii produkcji serów. Wyniki tych badań opublikowano w artykule:

- Knysz P., **Gondek M.**, Pyz-Łukasik R., Ziomek M., Drozd Ł., Paszkiewicz W., Szkucik K. (2018). Skład chemiczny i wartość odżywcza regionalnych serów podpuszczkowych produkowanych metodą tradycyjną. *Med. Weter.* 74(10), 671-675.

Jakość mikrobiologiczna serów produkowanych metodami tradycyjnymi i ich bezpieczeństwo dla potencjalnych konsumentów zależy od jakości mikrobiologicznej surowca użytego do produkcji, warunków higienicznych panujących w środowisku produkcyjnym, przestrzegania zasad higieny przez pracowników, a także czynników wpływających na ewentualne ich poprodukcyjne zanieczyszczenie. W badaniach dotyczących jakości mikrobiologicznej serów produkowanych metodami tradycyjnymi wraz z pracownikami Katedry Higieny Żywności Zwierzęcego Pochodzenia Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Lublinie dokonałem oceny zanieczyszczenia mikrobiologicznego (poprzez określenie ogólnej liczby: drobnoustrojów mezofilnych, bakterii psychrotrofowych, bakterii kwasu mlekowego, bakterii grupy coli, *E. coli*, bakterii z rodziny *Enterbacteriaceae*, bakterii z rodzaju *Staphylococcus* i *Enterococcus* oraz pleśni i drożdży) 3 rodzajów serów krótko i długo dojrzewających wyprodukowanych z surowego i pasteryzowanego mleka krowiego. Wykazano, że badane sery nie spełniały określonych w Rozporządzeniu 2073/2005 mikrobiologicznych kryteriów bezpieczeństwa żywności (obecność *L. monocytogenes*) oraz kryteriów higieny procesu (przekroczone dopuszczalne limity *E. coli* i koagulazo-dodatnich gronkowców). Przeprowadzone badania udowodniły, że istnieje konieczność wprowadzenia procedur korygujących dotyczących przestrzegania zasad GMP (Dobrej Praktyki Produkcyjnej) i GHP (Dobrej Praktyki Higienicznej) na etapie udoju (w przypadku serów długo dojrzewających, które produkowane są z mleka surowego), magazynowania mleka (w przypadku serów krótko dojrzewających dla których surowcem do produkcji było mleko pochodzące z zatwierdzonych mleczarni), produkcji, magazynowania i transportu serów, sprzedaży detalicznej oraz

szkolenia personelu z zakresu higienicznego przetwarzania mleka. Wykazano ponadto, że kontrola mikrobiologiczna przeprowadzona na poszczególnych etapach produkcji i dystrybucji serów umożliwiłaby określenie etapów, na których dochodzi do wzrostu zanieczyszczenia mikrobiologicznego surowca, produktu pośredniego lub produktu końcowego oraz pozwoliłaby na opracowanie i wdrożenie odpowiednich procedur naprawczych. Wykrycie jednak obecności *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus* w dwóch spośród trzech badanych rodzajów serów, świadczy o tym, że produkty te nie powinny być wprowadzone na rynek ze względu na zagrożenie, jakie stanowią dla potencjalnych konsumentów. Wyniki badań przedstawiono w publikacji:

- Pysz-Łukasik R., Knysz P., **Gondek M.** (2018). Hygiene quality and consumer safety of traditional short- and long-ripened cheeses from Poland. J. Food Qual. article ID 8732412.

*Listeria monocytogenes* stanowi zagrożenie dla zdrowia publicznego o czym świadczą pochodzące z krajów Unii Europejskiej dane z monitoringu chorób odzwierzęcych i odzwierzęcych czynników chorobotwórczych. Jak wykazano we wcześniejszych badaniach dotyczących jakości mikrobiologicznej serów tradycyjnych wytwarzanych w Polsce, produkty takie mogą stanowić źródło infekcji *L. monocytogenes* dla ludzi.

Technika z wykorzystaniem spektrometrii mas MALDI-TOF (ang. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) coraz częściej używana jest do identyfikacji drobnoustrojów zatruc pokarmowych, w tym tych z rodzaju *Listeria*. Metoda ta polega na analizie białek bakteryjnych w zakresie mas 2–20 kDa, które reprezentowane są głównie przez białka rybosomalne i białka metabolizmu podstawowego. Białka te tworzą specyficzny dla bakterii „odcisk palca”, który w porównaniu z profilami białkowymi zawartymi w bibliotece widm referencyjnych umożliwia określenie pozycji taksonomicznej drobnoustroju.

W kolejnej pracy dotyczącej bezpieczeństwa i jakości mikrobiologicznej serów produkowanych metodami tradycyjnymi w Polsce zbadano częstość występowania *Listeria monocytogenes* w rzemieślniczych serach wyprodukowanych z niepasteryzowanego mleka owczego lub zmieszanego mleka owczego i krowiego oraz dokonano oceny przydatności spektrometrii typu MALDI-TOF do identyfikacji szczepów *L. monocytogenes* pochodzących z tego typu środków spożywczych. Wykazano, że *L. monocytogenes* występowała w 6.2 % próbek przebadanych serów. Skuteczność identyfikacji *L. monocytogenes* uzyskanej za pomocą MALDI-TOF MS była zróżnicowana, a zdecydowana większość izolatów (27/32) dała następujący wynik: pewna identyfikacja rodzaju i prawdopodobna identyfikacja gatunku. Uzyskane wyniki potwierdziły zatem konieczność badania rzemieślniczych serów produkowanych w Polsce w kierunku *L. monocytogenes*. Poziomą identyfikację gatunkową szczepów *L. monocytogenes* wyizolowanych z serów rzemieślniczych przy pomocy MALDI-TOF MS był jednak niezadowolający, co wskazuje na potrzebę rozszerzenia bazy danych o widma masowe szczepów *L.*

*monocytogenes* pochodzących z tego rodzaju żywności. Wyniki przeprowadzonych badań opublikowano w artykule:

- Pyz-Łukasik R., **Gondek M.**, Winiarczyk D., Michalak K., Paszkiewicz W., Piróg-Komorowska A., Policht A., Ziomek M. (2021). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in artisanal cheeses from Poland and its identification by MALDI-TOF MS. *Pathogens* 10(6), 632.

*Listeria monocytogenes* charakteryzuje się dużym zróżnicowaniem genetycznym i zmienną wirulencją. Zróżnicowana zjadliwość bakterii powoduje, że nie wszystkie szczepy *L. monocytogenes* w równym stopniu zdolne są do wywoływania choroby u ludzi. Wykazano, że wiele różnych czynników wirulencji wpływa na patogenność *L. monocytogenes* umożliwiając jej m.in. inwazję do komórek gospodarza, przeżycie w nich i namnażanie się. Badania nad zmiennością genetyczną *L. monocytogenes* odgrywają kluczową rolę w zrozumieniu epidemiologii i mechanizmów warunkujących patogenność tego drobnoustroju. Stąd celem kolejnej pracy dotyczącej jakości mikrobiologicznej i bezpieczeństwa serów rzemieślniczych produkowanych metodami tradycyjnymi w Polsce była molekularna charakterystyka, wykrytych w nich, trzydziestu dwóch izolatów *L. monocytogenes* z zastosowaniem techniki sekwencjonowania całego genomu (*ang.* whole genome sequencing; WGS). Wykazano, że analizowane izolaty *L. monocytogenes* należały do następujących serogrup: IIa (46.9%), IVb (31.2%), IIc (12.5%) i IIb (9.4%). Badane izolaty sklasyfikowano ponadto w dwie linie filogenetyczne: II (59.4%) oraz I (40.6%). Wśród badanych izolatów wyodrębniono łącznie 18 różnych typów sekwencyjnych (ST): ST6 (15.6%), ST2 (9.4%), ST20 (9.4%), ST26 (9.4%), ST199 (9.4%), ST7 (6.3%), ST9 (6.3%), ST1 (3.1%), ST3 (3.1%), ST8 (3.1%), ST16 (3.1%), ST87 (3.1%), ST91 (3.1%), ST121 (3.1%), ST122 (3.1%), ST195 (3.1%), ST217 (3.1%) i ST580 (3.1%). W badaniach wykazano również, że wyizolowane z serów *L. monocytogenes* utworzyły 15 kompleksów klonalnych (CC): CC6 (15.6%), CC9 (12.5%), CC2 (9.4%), CC20 (9.4%), CC26 (9.4%), CC199 (9.4%), CC7 (6.3%), CC8 (6.3%), CC1 (3.1%), CC3 (3.1%), CC14 (3.1%), CC87 (3.1%), CC121 (3.1%), CC195 (3.1%) i CC217 (3.1%). Ponadto przebadano 40 różnych genów wirulencji i wykazano, że różnice pomiędzy poszczególnymi izolatami w zakresie występowania poszczególnych genów wirulencji obejmowały takie geny jak: *inl*, *actA*, LIPI-3, *ami*, *gtcA*, *aut*, *vip*, and *lntA*. Badania potwierdziły również, że mutacje powodujące powstanie przedwczesnych kodonów stop w *inlA* i brak LIPI-3 charakterystyczne są dla izolatów linii II. Z kolei cechą charakterystyczną izolatów należących do linii I jest obecność mutacji powodujących wystąpienie przedwczesnych kodonów stop w genie *plcB* i brak genu *vip*. Przeprowadzone badania udowodniły zatem, że produkowane w Polsce sery rzemieślnicze mogą być zanieczyszczone wirulentnymi szczepami *L. monocytogenes*. Co więcej, produkty pochodzące z tej samej partii (wytwarzane w tej samej serowni, w tych samych warunkach i w tym samym czasie) mogą jednocześnie zawierać izolaty należące do różnych grup molekularnych, serotypów, różnych linii filogenetycznych, typów sekwencyjnych i kompleksów klonalnych. Wyniki badań opublikowano w artykule:



- Pyz-Łukasik R., Paszkiewicz W., Kielbus M., Ziomek M., **Gondek M.**, Domaradzki P., Michalak K., Pietras-Ożga D. (2022). Genetic diversity and potential virulence of *Listeria monocytogenes* isolates originating from Polish artisanal cheeses. *Foods* 11(18), 2805.

#### 7.5.9. Jakość mikrobiologiczna i skład chemiczny mięsa bobrów (*Castor fiber* L.).

Mięso bobra zaliczane jest do dziczyzny i nie jest popularnym pokarmem w Polsce i na świecie; wykorzystywane jest ono głównie jako dodatek do produkcji przetworów mięsnych takich jak kiełbasy, burgery, paszteciki czy też pulpety. W ujęciu rocznym obserwuje się jednak wzrost liczby odstrzeliwanych bobrów w krajach regionu Morza Bałtyckiego. Przypuszczać zatem należy, że dostępność mięsa i produktów mięsnych wytwarzanych z tego gatunku zwierząt, również w Polsce, może istotnie wzrastać. Stąd celem podjętych badań, w których uczestniczyłem było określenie jakości mikrobiologicznej, pH i aktywności wody ( $a_w$ ) świeżego i mrożonego mięsa bobrów. Przeprowadzone badania uwzględniły również pozyskane z bobrów mięso mielone. Ocenę mikrobiologiczną mięsa (ogólna liczba mezofilnych bakterii tlenowych, bakterii psychrotrofowych, *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, *Staphylococcus*, bakterii kwasu mlekowego oraz pleśni i drożdży) przeprowadzono w czterech punktach czasowych, tj.: 24 godziny po odstrzeleniu zwierząt, w 7 i 14 dniu jego przechowywania w warunkach chłodniczych (4° C) oraz w 11 tygodniu po zamrożeniu (-18° C). W przeprowadzonych badaniach wykazano że podczas przechowywania mięsa bobrów liczba drobnoustrojów istotnie wzrastała. Ogólna liczba bakterii tlenowych w próbkach badanych 24 godziny po odstrzeleniu bobrów wynosiła 4.94 log jtk/g w przypadku mięśni wykrawanych ręcznie i 4.80 log jtk/g w mięsie mielonym. W 14 dniu przechowywania, wartości te statystycznie istotnie wzrosły ( $P < 0.05$ ) i wynosiły 8.33 i 8.08 log jtk/g odpowiednio dla mięsa świeżego i mięsa mielonego. Taki sam trend odnotowano dla wszystkich pozostałych analizowanych grup drobnoustrojów. Zanieczyszczenie mikrobiologiczne mięsa mrożonego było porównywalne z zanieczyszczeniem mięsa chłodzonego w 7 dniu jego przechowywania. W badanych próbkach nie stwierdzono również bakterii z rodzaju *Salmonella* i *Listeria*. Istotny spadek pH obserwowany był do dnia 14 zarówno dla mięsa wykrawanego ręcznie jak i mielonego (w 14 dniu przechowywania pH mięsa osiągnęło wartość 5.69, a mięsa mielonego 5.75).  $A_w$  mięsa wykrawanego ręcznie oraz mięsa mielonego w 14 dniu przechowywania osiągnęła wartość 0.988;  $a_w$  mięsa mrożonego w 11 tygodniu jego przechowywania (0.991) nie różniła się natomiast istotnie od  $a_w$  mięsa pozyskanego 24 godziny po odstrzeleniu zwierząt (0.993).

Badania wykazały, że jakość mikrobiologiczna mięsa bobrów w odniesieniu do wszystkich badanych bakterii była zadowalająca zarówno w próbkach badanych 24 godziny po odstrzeleniu jak również po 7 dniach ich przechowywania w chłodni i w 11 tygodniu po zamrożeniu. W okresach tych mielone mięso pozyskane z bobrów spełniało również kryteria higieny procesu (ogólna liczba bakterii tlenowych i liczba *E. coli*) oraz bezpieczeństwa żywności (brak *Salmonella* spp.) określone w Rozporządzeniu Komisji (WE) nr 2073/2005 w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych. Wykazano ponadto, że zanieczyszczenie mikrobiologiczne mięsa bobrów

stwierdzane 24 godziny po odstrzale związane jest z panującymi warunkami higienicznymi podczas patroszenia, skórowania i przygotowania tusz upolowanych zwierząt. Wyniki badań opublikowano w pracy:

- Ziomek M., Drozd Ł., **Gondek M.**, Pyz-Łukasik R., Pedonese F., Florek M., Domaradzki P., Skalecki P. (2021). Microbiological changes in meat and minced meat from beavers (*Castor fiber* L.) during refrigerated and frozen storage. *Foods* 10(6), 1270.

Zawartość kolagenu w mięśniach waha się od 1.5% do około 10% suchej masy, a ponad 90% kolagenu śródmięśniowego znajduje się w perymysium. Ilość i rozpuszczalność tkanki łącznej obecnej w różnych mięśniach szkieletowych lub różnych częściach danego mięśnia są głównymi czynnikami wpływającymi na twardość i kruchość mięsa. W dostępnej literaturze brakuje informacji dotyczących zawartości poszczególnych frakcji kolagenu w mięśniach szkieletowych bobrów. Stąd w kolejnych badaniach nad wartością odżywczą i składem chemicznym mięsa bobrów, wraz z pracownikami Katedry Oceny Jakości i Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych Wydziału Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki oraz Katedry Higieny Żywności Zwierzęcego Pochodzenia Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, dokonałem oceny zawartości i rozpuszczalności kolagenu oraz zawartości białka, tłuszczu i popiołu w trzech różnych mięśniach (grzbietowych, kończyny tylnej, łopatki) tusz dorosłych samców bobra europejskiego. Zaobserwowano istotny wpływ rodzaju badanego mięśnia bobra na skład podstawowy, frakcje kolagenu i siłę cięcia. Mięśnie łopatki, w porównaniu do pozostałych dwóch badanych mięśni, charakteryzowały się istotnie wyższą ( $P < 0.05$ ) zawartością tłuszczu (1.65%), kolagenu całkowitego (1.26%) i kolagenu nierozpuszczalnego, a także wyższymi wartościami siły cięcia oraz niższym procentowym udziałem kolagenu rozpuszczalnego. Niezależnie jednak od rodzaju mięśnia, w surowym mięsie bobrów stwierdzono stosunkowo wysoki udział rozpuszczalnej frakcji kolagenu (około 32%); jej zawartość była wyższa w porównaniu z mięsem wieprzowym i wołowym ( $< 25\%$ ), lecz niższa niż u kurecząt i królików ( $>40\%$ ). Oceniając zależności pomiędzy ilością kolagenu a kruchością mięsa wykazano, że mięso bobrów nie różni się istotnie od mięsa innych gatunków zwierząt hodowlanych. Siła cięcia w przypadku gotowanego mięsa była dodatnio skorelowana z ilością kolagenu całkowitego, kolagenu nierozpuszczalnego i jego zawartością procentową w tkance mięśniowej pozyskanej bezpośrednio po odstrzeleniu zwierząt ( $R = 0.597$ ,  $R = 0.594$  i  $R = 0.499$ ;  $P < 0.01$ ) oraz ujemnie z zawartością kolagenu rozpuszczalnego ( $R = -0.594$ ;  $P < 0.001$ ). Nie stwierdzono natomiast korelacji między siłą cięcia a zawartością kolagenu całkowitego i poszczególnych jego frakcji w gotowanym mięsie bobrów. Badania wykazały również, że zawartość kolagenu całkowitego i poszczególnych jego frakcji w surowej tkance mięśniowej bobrów jest lepszym wskaźnikiem kruchości dla gotowanego mięsa bobra niż ich ilość w mięsie poddanym obróbce termicznej. Wyniki badań opublikowano w pracy:

- Florek M., Domaradzki P., Skałeczki P., Ryszkowska-Siwko M., Ziomek M., Tajchman K, **Gondek M.**, Pyz-Łukasik R. (2022). Content and solubility of collagen and their relation to proximate composition and shear force of meat from different anatomical location in carcass of European Beaver (*Castor fiber*). Foods 2022, 11(9), 1288.

#### 7.5.10. Wartość odżywcza mięsa ryb – artykuł przeglądowy.

Ryby są cennym składnikiem diety, głównie ze względu na zawartość w ich mięsie pełnowartościowego białka oraz wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, w szczególności takich jak kwas eikozapentaenowy, kwas dokozaheksaenowy oraz kwas arachidonowy. Składniki te są niezbędne do prawidłowego wzrostu i rozwoju fizycznego, a także utrzymania dobrego stanu zdrowia; wykazano również że mogą zapobiegać niektórym chorobom. Udowodniono, że w grupie osób, którym zalecono zwiększone spożycie ryb, obserwowano spadek liczby zgonów z przyczyn chorób sercowo-naczyniowych nawet o 33%. Literatura przedmiotu wskazuje jednak na występowanie istotnych różnic w składzie chemicznym tkanki mięśniowej różnych gatunków ryb. Dostępne zatem tabele wartości odżywczej żywności nie mogą stanowić uniwersalnych i referencyjnych danych służących do planowania zbilansowanej diety w zakresie ilości spożywanych ryb. W artykule przeglądowym zebrano i przeanalizowane dostępne w literaturze światowej dane dotyczące zawartości białka, tłuszczu, aminokwasów i kwasów tłuszczowych w tkance mięśniowej różnych gatunków ryb słodko i słonowodnych powszechnie spożywanych na świecie takich jak: tołpyga, karp, pstrąg, okoń, amur, sum, jesiotr, leszcz, szczupak, płóc, sandacz, węgorz, śledź, łosoś i dorsz. Wyniki tych analiz przedstawiono w pracy:

- Pyz-Łukasik R., Chałabis-Mazurek A., **Gondek M.** (2020). Basic and functional nutrients in the muscles of fish: a review. Int. J. Food Prop. 23(1), 1941-1950.

W moim dorobku naukowym znajduje się również 11 doniesień konferencyjnych, z których 9 zostało opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Report. Szczegółowe dane na ich temat jak również informacje o wygłoszonych referatach na konferencjach krajowych i międzynarodowych znajdują się w Załączniku 4 (Wykaz osiągnięć naukowych albo artystycznych, stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny) do wniosku o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie weterynaria.

Lublin, 15.09.2022 r.



.....  
(podpis wnioskodawcy)