

AUTOREFERAT

1. **Małgorzata Adamska**

2. **Posiadany stopień naukowy** – doktor nauk biologicznych uzyskany na Wydziale Nauk Przyrodniczych (obecnie Wydział Biologii) Uniwersytetu Szczecińskiego w 2007 roku.

3. **Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:**

Lata 2002 - 2008 – stanowisko asystenta w Katedrze Genetyki Uniwersytetu Szczecińskiego.

Od roku 2008 do chwili obecnej – stanowisko adiunkta w Katedrze Genetyki Uniwersytetu Szczecińskiego.

4. **Osiągnięcie wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):** cykl jednotematycznych publikacji pt.

Doskonalenie i aplikacja metod molekularnych do monitoringu oraz genotypowania pierwotniaków chorobotwórczych występujących w naturalnych zbiornikach wodnych

a) na cykl publikacji składają się następujące pozycje:

1. **Adamska M.**, Leońska – Duniec A., Maciejewska A., Sawczuk M., Skotarczak B. 2010. Comparison of efficiency of various DNA extraction methods from cysts of *Giardia intestinalis* measured by PCR and TaqMan real – time PCR. Parasite. Journal de la Societe Française de Parasitologie 17: 299-305. **IF – 1,71; pkt MNiSW – 20; udział własny: 55%**
2. **Adamska M.**, Leońska – Duniec A., Maciejewska A., Sawczuk M., Skotarczak B. 2011. Recovery of DNA of *Giardia intestinalis* cysts from surface water concentrates measured with PCR and real time PCR. Parasite. Journal de la Societe Française de Parasitologie 18: 341-343. **IF – 1,0; pkt MNiSW – 20; udział własny: 70%**

3. **Adamska M.**, Leońska – Duniec A., Maciejewska A., Sawczuk M., Skotarczak B. 2011. PCR and real time PCR for the detection of *Cryptosporidium parvum* oocyst DNA. *Folia biologica (Kraków)* 59 (3-4): 115-120. **IF – 0,657; pkt MNiSW – 13; udział własny: 70%**
4. **Adamska M.**, Leońska-Duniec A., Maciejewska A., Sawczuk M., Skotarczak B. 2012. Recovery of *Cryptosporidium* from spiked water and stool samples measured with PCR and real time PCR. *Veterinari Medicina* 57(5): 224-232. **IF – 0,679; pkt MNiSW – 25; udział własny: 65%**
5. **Adamska M.**, Leońska-Duniec A., Łanocha N., Skotarczak B. 2014. Thermophilic potentially pathogenic amoebae isolated from natural water bodies in Poland and their molecular characterization. *Acta Parasitologica* 59 (3): 243-246. **IF – 0,905; pkt MNiSW – 15; udział własny: 70%**
6. **Adamska M.**, Sawczuk M., Kolodziejczyk L., Skotarczak B. 2015. Assessment of molecular methods as a tool for detecting pathogenic protozoa isolated from water bodies. *Journal of Water and Health* 13(4): 953-9. **IF – 1,458; pkt MNiSW – 20; udział własny: 70%**
7. **Adamska M.** 2015. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* occurring in natural water bodies in Poland. *Parasitology Research* 114 (2): 687-692. **IF – 2,098; pkt MNiSW – 30**
8. **Adamska M.** 2016. Molecular characterization of *Acanthamoeba* spp. occurring in water bodies and patients in Poland and redefinition of Polish T16 genotype. *Journal of Eucaryotic Microbiology*: 63(2):262-270. **IF – 3,217; pkt MNiSW – 25**

Sumaryczny Impact Factor wymienionych publikacji (zgodny z rokiem opublikowania, z wyjątkiem pozycji 7 i 8 opublikowanych odpowiednio w 2015 i 2016 roku, dla których podano najnowszy dostępny IF, tj. z 2014 roku) wynosi **11.724**. Sumaryczna liczba punktów MNiSW (zgodnie z rokiem opublikowania) dla wymienionych publikacji wynosi **168**. Sumaryczny Impact Factor publikacji wyliczony zgodnie z najnowszą dostępną punktacją (z roku 2014) wynosi **11.443**, natomiast suma punktów MNiSW zgodnie z punktacją z 2016 roku wynosi **170**. Publikacje 1-6 są wieloautorskie, a oświadczenia współautorów i opis indywidualnego wkładu habilitanta w powstanie tych prac znajdują się w załączniku 5.

b) omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników

Od początku mojej pracy zawodowej obiektem mojego zainteresowania były patogeny środowiskowe, zarówno bakterie, jak i pierwotniaki. Prowadzone przeze mnie badania dotyczyły najpierw głównie patogenów odkleszczowych, następnie zwróciłam uwagę na pierwotniaki przenoszone za pośrednictwem wody, którymi zajmuję się od 2008 roku. Zarówno patogeny odkleszczowe, jak i wodnopochoodne mają istotne znaczenie dla zdrowia ludzi i zwierząt, gdyż ryzyko infekcji wzrasta ze względu na coraz większą popularność podróży oraz aktywnego spędzania czasu na terenach występowania tych patogenów. Wpływ na wzrost częstości epidemii ma również starzenie się społeczeństw i wzrastająca liczba osób z niedoborami immunologicznymi, gdyż osoby starsze i z obniżoną odpornością są bardziej podatne na infekcje, podobnie jak dzieci i kobiety ciężarne.

Pierwotniaki wodnopochoodne to zróżnicowana grupa organizmów należących do różnych grup systematycznych w obrębie Protozoa. Ich cechą wspólną jest przenoszenie form dyspersyjnych (cyst lub oocyst) za pośrednictwem wody. Obiektem moich badań są zarówno pasożyty jelitowe przedostające się do organizmu człowieka drogą fekalno – oralną, będące przyczyną niespecyficznego objawów ze strony przewodu pokarmowego, jak i wolno żyjące pełzaki (*free living amoebae* – FLA) należące do grupy tzw. pełzaków amfizoicznych, tzn. mogących również w sprzyjających warunkach wnikać do organizmu żywiciela i przechodząc na pasożytniczy tryb życia powodować zapalenie mózgu i/lub rogówki. Wrotami inwazji dla pierwotniaków wodnopochoodnych mogą być: błona śluzowa jamy nosowej i ustnej, rogówka oka, uszkodzona skóra lub śluzówka jelita, bądź też zmiany w układzie oddechowym. Zarażeniu tymi patogenami sprzyja aktywność związana z korzystaniem z naturalnych i sztucznych zbiorników wodnych, korzystanie z punktów żywienia zbiorowego, które nie zawsze przestrzegają zasad higieny, a także rosnąca popularność soczewek kontaktowych powodujących mikrouszkodzenia rogówki. Rozprzestrzenianie się infekcji jest ułatwione ze względu na niską dawkę inwazyjną i oporność form dyspersyjnych na czynniki zewnętrzne, w tym procesy uzdatniania wody, oraz szeroki krąg żywicieli. W przypadku pierwotniaków przenoszonych drogą fekalno – oralną na wzrost prawdopodobieństwa zarażenia wpływa również duża liczba cyst lub oocyst wydalanych z kałem.

Pierwotniaki wodnopochoodne stanowią realne zagrożenie dla zdrowia publicznego, dlatego też ich monitoring w zbiornikach wodnych wykorzystywanych przez człowieka jest niezwykle istotny dla oceny ryzyka zarażenia ludności. Ze względu na duże rozproszenie cyst i oocyst tych pierwotniaków w środowisku wodnym w porównaniu z próbami klinicznymi,

do ich monitoringu w zbiornikach wodnych niezbędne jest zastosowanie odpowiednio wydajnej metody ich izolacji ze środowiska wodnego, a następnie metod detekcji charakteryzujących się wysoką czułością. W celu udoskonalenia i ujednolicenia monitoringu form dyspersyjnych *Cryptosporidium* i *Giardia* w środowisku wodnym, Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (United States Environmental Protection Agency – USEPA) opracowała Metodę 1622 (dla *Cryptosporidium*), a następnie Metodę 1623 (dla *Cryptosporidium* i *Giardia*). Metody te określają sposoby filtracji, odzysku, zagęszczania, oczyszczania i wykrywania tych pierwotniaków. Po otrzymaniu zagęszczonej próbki wody przewidują zastosowanie separacji immunomagnetycznej (*immunamagnetic separation* – IMS) w celu wyizolowania z próby cyst i oocyst *Cryptosporidium* i *Giardia*, a następnie ich wykrywanie metodami mikroskopowymi lub z wykorzystaniem immunofluorescencji. Zaletą Metod 1622 i 1623 jest niewątpliwie znaczna redukcja objętości badanej próby i zwiększenie w niej koncentracji form dyspersyjnych pierwotniaków. Technika IMS ogranicza jednak badania obecności pierwotniaków w wodzie do wykrywania tylko dwóch rodzajów - *Cryptosporidium* i *Giardia* oraz generuje wysokie koszty. Poza tym wynik zastosowania tej metody jest zmienny i zależy m.in. od użytego komercyjnego zestawu. Techniki wykrywania pierwotniaków przewidziane w Metodach 1622 i 1623 charakteryzują się niższą specyficznością niż np. metody molekularne i nie pozwalają na określenie gatunku, ani tym bardziej genotypu wykrytych pierwotniaków, co jest niezbędne do ustalenia, czy wykazują one potencjał chorobotwórczy. Wśród pierwotniaków należących do jednego gatunku obserwuje się bowiem heterogenność genetyczną, przy czym tylko szczepy należące do niektórych genotypów charakteryzują się chorobotwórczością.

Z powyższych względów, wraz z zespołem Katedry Genetyki Wydziału Biologii Uniwersytetu Szczecińskiego, we współpracy z Katedrą i Zakładem Biologii i Parazytologii Medycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, podjęłam próbę modyfikacji Metody 1623. Modyfikacje te polegały na pominięciu techniki IMS oraz zastosowaniu do detekcji pierwotniaków nie tylko metody mikroskopowej, ale także metod molekularnych o wysokiej czułości i specyficzności. Pozwoliłoby to na wykrywanie i genotypowanie pierwotniaków należących do wielu rodzajów (2, 4). Istotnym etapem badań molekularnych *Cryptosporidium* i *Giardia* jest izolacja DNA z ich form przetrwalnikowych. Ze względu na ich wysoką odporność na warunki zewnętrzne konieczny jest dobór odpowiednio skutecznej metody ekstrakcji materiału genetycznego oraz zastosowanie procedur przedizolacyjnych w celu zniszczenia ścian cyst i oocyst. W literaturze opisywane były rozmaite metody zarówno wstępnego rozbicia form przetrwalnikowych, jak i izolacji

DNA, jednakże moje wstępne badania wykazały, że nie wszystkie są skuteczne. Dlatego też konieczne okazały się badania mające na celu opracowanie metody izolacji DNA z form dyspersyjnych *Cryptosporidium* i *Giardia* charakteryzującej się maksymalną skutecznością. Konieczne było również ustalenie odpowiedniego protokołu PCR do detekcji DNA tych pierwotniaków (1, 3). Badania te zostały sfinansowane z grantu własnego nr N N404 248635 pt. „Ocena przydatności wysoce specyficznej techniki makromacierzy RLB (Reverse Line Blot) do różnicowania gatunków pierwotniaków chorobotwórczych izolowanych ze zbiorników wodnych Pomorza Zachodniego” (2008-2011), w którym byłam wykonawcą, a kierownikiem grantu była prof. dr hab. Bogumiła Skotarczak.

Badania mające na celu porównanie różnych metod izolacji DNA z (oo)cyst *Cryptosporidium* i *Giardia* (1, 3) obejmowały dwanaście różnych protokołów izolacji DNA. Dodatkowo zastosowane zostały dwie różne wersje inkubacji materiału z proteinazą K różniące się czasem i temperaturą inkubacji. Efektywność izolacji DNA sprawdzana była poprzez wykonanie reakcji semi-nested PCR i TaqMan real time PCR dla izolatów z cyst *Giardia* z wykorzystaniem jako markerów odpowiednio: genu β -giardyny i genu kodującego małą podjednostkę rRNA (1) oraz nested PCR i TaqMan nested real time PCR na bazie genu kodującego małą podjednostkę rRNA dla izolatów z oocyst *Cryptosporidium* (3). Zastosowanie nested i semi-nested PCR miało na celu zwiększenie czułości metody poprzez otrzymanie większej ilości produktów reakcji.

W przypadku obydwu pierwotniaków, sygnał klasycznej reakcji PCR otrzymałam dla izolatów uzyskanych przy zastosowaniu czterech protokołów izolacji z wykorzystaniem zestawów do izolacji DNA z tkanek zwierzęcych oraz z kału (Qiagen). Wyniki klasycznej reakcji PCR zostały potwierdzone przez wyniki PCR w czasie rzeczywistym. Dodatkowo metoda TaqMan real time PCR wykazała się wyższą czułością i pozwoliła na detekcję DNA zarówno *Cryptosporidium*, jak i *Giardia* w izolatach uzyskanych za pomocą pięciu dodatkowych protokołów ekstrakcji, dla których nie uzyskano produktów klasycznej reakcji PCR, w tym dla dwóch protokołów z wykorzystaniem zestawu do izolacji DNA z gleby (MP Biomedicals) (1, 3). Podsumowując, najbardziej efektywna okazała się ekstrakcja materiału genetycznego za pomocą zestawu do izolacji DNA z tkanek, a efektywność wzrastała przy wydłużeniu inkubacji materiału z proteinazą K. Krótsza inkubacja nawet w wyższej temperaturze skutkowała niższą efektywnością izolacji. W celu skutecznej izolacji DNA z (oo)cyst *Giardia* i *Cryptosporidium* niezbędne było zastosowanie procedur przedizolacyjnych mających na celu rozbicie ich ścian. Jedynymi skutecznymi procedurami były: naprzemienna inkubacja materiału w temperaturze 100°C i w ciekłym azocie (szok

termiczny) oraz nieco mniej skuteczna sonikacja. W celu oszacowania efektywności izolacji DNA z form dyspersyjnych *Giardia* i *Cryptosporidium* oraz czułości zastosowanych protokołów PCR, przeprowadziłam również badania mające wyznaczyć limit detekcji DNA cyst i oocyst, tzn. ich najmniejszą liczbę użytą do pojedynczej izolacji materiału genetycznego, która umożliwia wykrycie DNA we wszystkich badanych próbach. Limit detekcji okazał się najniższy dla zestawu do izolacji DNA z tkanek i najwyższy dla zestawu do izolacji z gleby, a także niższy dla PCR w czasie rzeczywistym niż dla klasycznej reakcji PCR (1, 3).

Badania opisane powyżej (1, 3) pozwoliły na opracowanie najefektywniejszej metody izolacji DNA z cyst i oocyst *Cryptosporidium* i *Giardia* oraz potwierdziły, że izolacja DNA z form dyspersyjnych tych pierwotniaków jest niezwykle istotnym etapem badań ze względu na wysoką odporność (oo)cyst na czynniki zewnętrzne łącznie z czynnikami działającymi na nie podczas izolacji. Zwłaszcza izolacja DNA z cyst *Giardia* może narażać na trudności ze względu na ich grubsze ściany niż w przypadku oocyst *Cryptosporidium*, co znalazło swoje odbicie w wynikach moich badań - limit detekcji (oo)cyst był zawsze wyższy dla *Giardia* niż dla *Cryptosporidium* (1, 3). Ponadto uzyskanie dobrej jakości izolatów DNA o odpowiednio wysokim stężeniu jest warunkiem koniecznym do wykonania analizy o wysokiej czułości, pozwalającej na wykrycie DNA pierwotniaków nawet w przypadku ich dużego rozproszenia w środowisku. Ma to szczególne znaczenie w przypadku pierwotniaków wodnopochoodnych, takich jak *Cryptosporidium* i *Giardia*, które mimo dużej liczby form dyspersyjnych wydalanych przez żywicieli występują w wodzie w małej ilości. Następuje też pewna strata części cyst i oocyst pierwotniaków podczas obróbki prób wody przed izolacją DNA, co ma znaczący wpływ na możliwość ich późniejszej detekcji. Badania te pozwoliły również na porównanie czułości klasycznej reakcji PCR i PCR w czasie rzeczywistym, a porównanie wypadło na korzyść techniki real-time PCR (1, 3).

Dla zwiększenia czułości metod wykrywania pierwotniaków wodnopochoodnych, niezależnie od typu tych metod, istotna jest wcześniejsza koncentracja prób wody w celu zmniejszenia ich objętości przy zachowaniu zawartych w nich form dyspersyjnych. Kolejny etap badań (2, 4) miał na celu podjęcie próby wspomnianej wcześniej modyfikacji Metody 1623, a także ocenę jej skuteczności po wprowadzonych zmianach. Celem tych badań była także ocena wpływu inhibitorów zawartych w wodzie z naturalnych zbiorników wodnych na przebieg reakcji PCR i opracowanie metody pozwalającej na ich usunięcie lub zniesienie ich działania. Aby zrealizować założone cele, przeprowadzona została procedura filtracji i koncentracji 10-litrowych prób wody, zarówno destylowanej, jak i pochodzącej

z naturalnego zbiornika wodnego, w których umieściłam cysty *Giardia* (2) lub oocysty *Cryptosporidium* (4) w równej liczbie dla różnych typów wody. Do filtracji i koncentracji prób wody posłużył zestaw Manual Filtra-Max® Wash Station firmy IDEXX rekomendowany w protokołach Metod 1622 i 1623. Następnie tak przygotowane próby wody posłużyły do izolacji DNA z form przetrwalnikowych pierwotniaków, do której zastosowana została najbardziej efektywna metoda opracowana i opisana w poprzednim etapie badań (1, 3). Efektywność zastosowanej metody odzysku cyst i oocyst pierwotniaków z prób wody sprawdziłam poprzez zastosowanie klasycznej reakcji PCR oraz PCR w czasie rzeczywistym, opisanych wcześniej (1, 3). Próby środowiskowe obfitują w różnego rodzaju inhibitory, które mogą zostać wyekstrahowane razem z DNA i negatywnie wpływają na przebieg reakcji PCR. Dlatego też we wszystkich protokołach PCR zastosowałam w mieszaninie reakcyjnej dodatek (w dziesięciu różnych stężeniach) albuminy surowicy bydlęcej (*bovine serum albumin* - BSA), wiążącej inhibitory w izolatach z wody z naturalnych zbiorników wodnych. BSA jest jednym z najefektywniejszych i szeroko stosowanych odczynników deaktywujących inhibitory, jednak jego stosowanie w reakcji PCR w czasie rzeczywistym było do tej pory rzadkością (2, 4).

Wyniki tych badań potwierdziły obecność inhibitorów PCR w wodzie z naturalnego zbiornika wodnego, gdyż sygnał klasycznej reakcji PCR był silniejszy dla izolatów uzyskanych z wody destylowanej niż tych uzyskanych z wody pobranej z jeziora, mimo umieszczenia w tych próbach wody takiej samej liczby form dyspersyjnych. Ponadto dodatek wiążącego inhibitory BSA do mieszaniny reakcyjnej w klasycznej reakcji PCR oraz PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem izolatów z prób wody pobranej z jeziora podwyższył siłę sygnału. Nie tylko zbyt niskie, ale również zbyt wysokie stężenie BSA w mieszaninie reakcyjnej powodowało zmniejszenie siły sygnału w obydwu protokołach PCR (2, 4). Wyznaczenie optymalnego stężenia BSA w mieszaninie reakcyjnej było niezwykle istotne, gdyż według dostępnych danych literaturowych stężenia optymalne wyznaczone przez różnych autorów obejmowały bardzo szeroki zakres, ponadto badania na temat zastosowania albuminy w reakcji real - time PCR były nieliczne. Optymalne stężenie BSA może znacznie się wahać w zależności od ilości i rodzaju inhibitorów, typu próby, wykrywanego organizmu czy właściwości matrycy DNA oraz, jak wykazały moje badania, zastosowanego protokołu PCR (2, 4). Dlatego też niezbędne jest doświadczalne wyznaczenie optymalnego stężenia BSA dla konkretnego typu badań.

Kolejnym etapem badań nad chorobotwórczymi pierwotniakami wodnopochodnymi był ich monitoring w naturalnych zbiornikach wodnych województwa zachodniopomorskiego

wykorzystywanych przez człowieka, w celu ustalenia składu gatunkowego tych pierwotniaków i sezonowości ich występowania w tych zbiornikach oraz oceny ryzyka zarażenia (6). Wraz z zespołem Katedry Genetyki przebadalam próby wody z 50 stanowisk pochodzących z 36 zbiorników wodnych. Próby były pobierane w okresie 3-letnim, cztery razy w roku (od zimy 2009 roku do jesieni 2012 roku) poprzez filtrację każdorazowo 50 litrów wody przy użyciu filtra modułowego wchodzącego w skład zestawu Manual Filta-Max® Wash Station firmy IDEXX. Następnie próby poddawane były koncentracji i dalszym badaniom według zmodyfikowanej Metody 1623 opracowanej i opisananej wcześniej (1 - 4). Obecność DNA *Cryptosporidium* wykryłam za pomocą klasycznej reakcji PCR w próbach wody pobranych z trzech zbiorników wodnych, natomiast *Giardia* – w próbach pobranych z czterech zbiorników. Sekwencjonowanie uzyskanych amplikonów wykazało, że wykryte pierwotniaki należą do gatunków *Cryptosporidium parvum* i *Giardia intestinalis* chorobotwórczych dla człowieka. Jeziora, w których wykryłam obecność tych pierwotniaków, są wykorzystywane jako kąpieliska, istnieje więc ryzyko zarażenia ludzi poprzez połknięcie wody zawierającej ich (oo)cysty. Odsetek zbiorników wodnych, w których wykryłam obecność DNA pierwotniaków był niewielki (0,5% wszystkich prób wody dla *C. parvum* i 0,6% dla *G. intestinalis*), a pierwotniaki nie były obecne w badanej próbce wody z danego zbiornika co roku i o każdej porze roku, co znacznie obniża ryzyko zarażenia. Tak niski odsetek dodatnich prób jest spowodowany najprawdopodobniej znacznym rozproszeniem form przetrwalnikowych w wodzie, jednak ze względu na niską dawkę inwazyjną należy brać pod uwagę możliwość zarażenia. Nie wykryłam DNA *Cryptosporidium* i *Giardia* za pomocą metody PCR w czasie rzeczywistym (6).

W celu porównania i wybrania najbardziej skutecznej metody detekcji pierwotniaków w próbach wody z naturalnych zbiorników wodnych, oprócz dwóch protokołów PCR zastosowałam również technikę makromacierzy RLB (Reverse Line Blot), która miała na celu detekcję pierwotniaków Sporozoa (*C. parvum*, *Toxoplasma gondii*, *Cyclospora cayetanensis*, *Sarcocystis hominis* i *Isoospora belli*) oraz z gatunku *Balantidium coli*. Zastosowano także metodę mikroskopową z użyciem zmodyfikowanego barwienia Kinyoun'a dla *Cryptosporidium* i barwienia płynem Lugola dla *Giardia*. Metoda RLB pozwoliła na wykrycie DNA *C. parvum* w jednej próbce wody, w której wcześniej wykryłam DNA tego pierwotniaka za pomocą klasycznej metody PCR. Nie wykryto pierwotniaków w badanych próbach za pomocą metody mikroskopowej (6). Klasyczna metoda PCR wykazała się więc najwyższą czułością, ponadto jako jedyna spośród zastosowanych technik (w połączeniu z sekwencjonowaniem uzyskanych amplikonów) pozwala na dokładne określenie nie tylko

gatunku, ale także genotypu wykrytych pierwotniaków. Jest to niezwykle istotne dla oceny ich chorobotwórczości, gdyż nie wszystkie gatunki oraz nie wszystkie szczepy reprezentujące określone genotypy stanowią zagrożenie dla zdrowia.

Uzyskane sekwencje genu kodującego 18S rRNA *Cryptosporidium* i β -giardinę *Giardia* wykorzystałam do genotypowania i analizy filogenetycznej wykrytych szczepów tych pierwotniaków w celu dokładnego określenia ich przynależności systematycznej i na tej podstawie ustalenia ich patogenności (7). Spośród trzech uzyskanych przeze mnie sekwencji *Cryptosporidium*, jedna okazała się identyczna z sekwencją reprezentującą genotyp bydlęcy *C. parvum* oraz z liczną grupą sekwencji pochodzących m.in. od szczepów *C. parvum* wyizolowanych od pacjentów z kryptosporydiozą pochodzących z różnych krajów. Dwie pozostałe sekwencje okazały się unikatowe, a ich podobieństwo do sekwencji opisanych powyżej wynosiło 99,87%. Wszystkie wymienione sekwencje tworzyły również wspólny kład w obrębie drzewa filogenetycznego. Wyniki te świadczą o przynależności wykrytych przeze mnie szczepów do gatunku *C. parvum*, który wspólnie z gatunkiem *Cryptosporidium hominis* przyczynia się do 90% przypadków kryptosporydiozy u ludzi. Dane te pozwalają wnioskować, że zidentyfikowane przeze mnie w zachodniopomorskich zbiornikach wodnych szczepy *C. parvum* mają potencjał chorobotwórczy, zwłaszcza, że wiele sekwencji uzyskanych przez innych autorów i wykazujących wysokie podobieństwo do sekwencji otrzymanych przeze mnie pochodzi od szczepów wyizolowanych od pacjentów z kryptosporydiozą. Otrzymane przeze mnie sekwencje *Giardia* wykazały 100% lub 99% podobieństwa z sekwencją reprezentującą genotyp B *G. intestinalis*, uzyskaną ze szczepu wyizolowanego z kału pacjenta z giardiozą oraz z grupą sekwencji uzyskanych ze szczepów wyizolowanych od ludzi pochodzących z różnych krajów. Wszystkie te sekwencje grupowały też razem w obrębie drzewa filogenetycznego. Genotyp B jest jednym z dwóch chorobotwórczych dla człowieka, istnieje więc ryzyko nabycia giardiozy poprzez kontakt z wodą ze zbiorników, w których wykryłam *G. intestinalis*. Moje wyniki analizy filogenetycznej wykazują odrębność zarówno genotypu bydlęcego *C. parvum* od pozostałych genotypów tego gatunku, jak i wyraźny dystans genetyczny genotypów A, B oraz E *G. intestinalis*. Wyniki te są zgodne z wynikami uzyskanymi wcześniej przez innych autorów, którzy na ich podstawie zaproponowali uznanie genotypu bydlęcego *C. parvum* za odrębny gatunek, a także uznanie za odrębne gatunki wszystkich sześciu genotypów (A – F) *G. intestinalis* (7). Genotypowanie, razem z danymi dotyczącymi zbiornika wodnego, z którego pobierana była woda oraz wiedzą na temat specyficzności żywicielskiej

poszczególnych gatunków i genotypów *Cryptosporidium* i *Giardia*, posłużyło także do ustalenia źródła (oo)cyst tych pierwotniaków w poszczególnych zbiornikach (7).

Modyfikacja Metody 1623 zastosowanej do badania prób wody ze zbiorników wodnych województwa zachodniopomorskiego pozwoliła na monitoring w tych zbiornikach również pełzaków należących do różnych rodzajów (5). W badaniach tych skupiłam się na pełzakach termofilnych, gdyż wśród pełzaków tolerujących wysoką temperaturę znaczną przewagę mają szczepy chorobotwórcze, a nietermofilne ameby chorobotwórcze są rzadkością. Zastosowany test tolerancji termicznej nie jest więc wystarczającym narzędziem do oceny chorobotwórczości pełzaków. Test ten pozwolił jednak na ograniczenie liczby prób, w których wykrywana była obecność DNA pełzaków oraz na zwiększenie liczby ich komórek w uzyskanym materiale, a co za tym idzie – na zwiększenie ilości DNA w izolacie uzyskanym z materiału z hodowli. W uzyskanych izolatach wykrywałam za pomocą klasycznej metody PCR obecność pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* oraz gatunków: *Hartmannella vermiformis*, *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrilaris* oraz *Sappinia pedata*. Wykryłam obecność DNA szczepów termofilnych najczęściej występujących w środowisku pełzaków: z rodzaju *Acanthamoeba* w 6,5% wszystkich badanych prób wody, a z gatunku *H. vermiformis* – w 3,5% wszystkich prób. Pełzaki *Acanthamoeba* były obecne w pięciu zbiornikach wodnych, podobnie jak *H. vermiformis*. Jest to pierwszy przypadek wykrycia gatunku *H. vermiformis* w polskich zbiornikach wodnych. W przypadku czterech prób wody pochodzących z dwóch zbiorników wykryłam koinfekcję obydwoma pełzakami (5). Badań obecności *Acanthamoeba* w naturalnych zbiornikach wodnych na terenie Polski jest niewiele i dotyczą one zbiorników województwa zachodniopomorskiego oraz lubuskiego, a autorzy badań uzyskali podobną prewalencję tych pełzaków w badanych zbiornikach. Do detekcji DNA ameb zastosowałam także metodę RLB, jednak podobnie jak w przypadku pierwotniaków z rodzajów *Cryptosporidium* i *Giardia*, okazała się ona znacznie mniej czuła niż klasyczna metoda PCR (5).

Sekwencjonowanie uzyskanych amplikonów tzw. fragmentu AMI genu kodującego 18S rRNA potwierdziło przynależność systematyczną wykrytych pełzaków do *Acanthamoeba* spp. lub *H. vermiformis*, oraz pozwoliło na określenie ich genotypu (5). Genotypowanie jest najbardziej przydatną metodą identyfikacji pełzaków o potencjale chorobotwórczym. Część wykrytych szczepów z rodzaju *Acanthamoeba* należała do genotypu T4 - wykazywały one duże podobieństwo sekwencji (99,63% - 100%) m.in. do szczepów T4 wyizolowanych w Polsce od noworodka z atypowym zapaleniem płuc i pacjenta z białaczką oraz w Korei z rogówki pacjenta chorego na pełzakowe zapalenie rogówki (5). Pozostałe szczepy

reprezentowały genotyp zidentyfikowany po raz pierwszy w 2009 roku w Polsce również u noworodka z atypowym zapaleniem płuc oraz u pacjenta z białaczką i opisany przez zespół Katedry Genetyki Uniwersytetu Szczecińskiego we współpracy z zespołem Katedry i Zakładu Biologii i Parazytologii Medycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego jako „T16” (99,68% - 100% podobieństwa). Jest to pierwszy na świecie przypadek wykrycia szczepu reprezentującego ten genotyp w środowisku wodnym (5). Genotyp T4 jest odpowiedzialny za większość (ponad 94%) przypadków pełzakowego zapalenia rogówki, a także za ziarniniakowe zapalenie mózgu i inne infekcje. Chorobotwórczość szczepów reprezentujących genotyp nazwany w 2009 roku „T16” jak dotąd nie została potwierdzona, jednak ponieważ wykryto je u pacjentów, istnieje ryzyko, że mogą one być patogenne dla ludzi. Chorobotwórczość gatunku *H. vermiformis* jest dyskusyjna, jednakże może powodować on zapalenie rogówki, ponadto został on wcześniej wyizolowany od pacjenta z zapaleniem mózgu i opon mózgowych oraz płuc i oskrzeli. Kontakt ludności z wodą z siedmiu zbiorników, w których stwierdzono obecność pełzaków może więc skutkować spowodowanymi przez nie zachorowaniami, zwłaszcza, że zbiorniki te są w większości wykorzystywane w sezonie letnim jako kąpieliska. Zagrożenie może stanowić szczególnie woda z czterech jezior, w których występował szczep T4 o potwierdzonej wobec człowieka chorobotwórczości. Ponadto sekwencje wykrytych szczepów *H. vermiformis* wykazywały wysoki stopień podobieństwa (ponad 99%) do sekwencji pozyskanych ze szczepów wyizolowanych z tkanki skrzeli pstrąga tęczowego *Oncorhynchus mykiss* będących przyczyną choroby skrzeli u tych ryb. Wykryte w zachodniopomorskich zbiornikach wodnych szczepy mogą więc mieć potencjał chorobotwórczy wobec pstrągów (5). *H. vermiformis* może stanowić ważny problem ekonomiczny ze względu na możliwość powodowania epidemii wśród ryb, co zdarzało się m.in. w południowo-zachodnich Niemczech. Należy również wziąć pod uwagę ryzyko przenoszenia przez pełzaki, również niechorobotwórcze, patogennych bakterii, wirusów i pierwotniaków, przez co również pośrednio mogą one stwarzać zagrożenie dla zdrowia człowieka.

Systematyka pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* opiera się obecnie na genotypowaniu z wykorzystaniem sekwencji genu kodującego 18S rRNA. Krótsze fragmenty tego genu, np. fragment AMI o długości około 850 pz, który był amplifikowany w celu detekcji tych pełzaków w próbach wody (5), są przydatne do detekcji już znanych genotypów, natomiast aby zidentyfikować nowy genotyp lub przeprowadzić analizę filogenetyczną, należy uzyskać sekwencję całego genu lub jego fragmentu o długości co najmniej 2 kpz. Gen kodujący 18S rRNA jest genem konserwatywnym, zawiera jednak osiem regionów o wysokiej zmienności,

które muszą być uwzględnione w przypadku identyfikacji nowych genotypów i badania historii ewolucyjnej szczepów reprezentujących poszczególne genotypy. Analiza na bazie krótszych fragmentów, np. fragmentu AMI obejmującego tylko pięć z ośmiu zmiennych regionów, powoduje zawyżenie dystansu genetycznego oraz błędną topologię drzewa filogenetycznego. Dlatego też, w celu poprawnej identyfikacji genotypowej polskich szczepów *Acanthamoeba* określonych jako genotyp „T16” oraz przeprowadzenia analizy filogenetycznej wszystkich czterech szczepów wyizolowanych od polskich pacjentów oraz szczepów wykrytych w naturalnych (5) i sztucznych (II.1.2 - 6) zbiornikach wodnych województwa zachodniopomorskiego, zamplifikowałam fragmenty genu kodującego 18S rRNA tych szczepów, o długości ponad 2 kpz (8). Do amplifikacji wykorzystałam protokół dostępny w literaturze, który zmodyfikowałam zastępując jeden ze starterów starterem zaprojektowanym samodzielnie. Modyfikacja ta miała na celu dostosowanie protokołu do amplifikacji fragmentu genu dla wszystkich trzech genotypów wstępnie zidentyfikowanych w badanych próbach (T4 i „T16” w próbach od pacjentów i ze zbiorników wodnych oraz T11 zidentyfikowany tylko w sztucznych zbiornikach wodnych).

Uzyskane sekwencje porównałam ze sobą oraz z homologicznymi sekwencjami dostępnymi w bazie danych Banku Genów, a także przeprowadziłam analizę filogenetyczną na podstawie porównań tych sekwencji. Wyniki analiz wykorzystałam do ustalenia przynależności systematycznej badanych szczepów (8). Konieczność wykonania analiz sekwencji genu kodującego 18S rRNA o długości ponad 2 kpz w celu poprawnego zaklasyfikowania polskich szczepów określonych jako genotyp „T16” podkreślało w swoich publikacjach wielu autorów, gdyż w systematyce tego genotypu istniało wiele nieścisłości. Po raz pierwszy jako „T16” zostały nazwane genotypy dwóch szczepów wyizolowanych od polskich pacjentów w 2009 roku, a szczepy reprezentujące ten sam genotyp zostały następnie zidentyfikowane w polskich zbiornikach wodnych (5, II.1.2 - 6). Rok później włoski zespół badawczy również opisał jako genotyp „T16” dwa kolejne szczepy wyizolowane z prób wody, mimo, że reprezentowały one nowy genotyp, odmienny od genotypu polskich szczepów opisanych w 2009 roku. W 2013 roku pojawiły się kolejne dwie prace, których autorzy także określili nowo wykryte genotypy jako „T16”. Spośród tych genotypów jedynie ten opisany w 2010 roku został poprawnie wyodrębniony na podstawie analizy sekwencji fragmentów genu kodującego 18S rRNA o długości co najmniej 2 kpz. Aby prawidłowo ustalić przynależność systematyczną pozostałych genotypów określonych jako „T16”, należałoby przeprowadzić analizę sekwencji niemal całego genu.

Moje badania wykorzystujące długie fragmenty genu kodującego 18S rRNA *Acanthamoeba* (8) potwierdziły przynależność systematyczną szczepów reprezentujących genotypy T4 i T11, ustaloną wcześniej na bazie sekwencji fragmentu AMI tego genu, a wyniki porównania par sekwencji i analizy filogenetycznej były zgodne. Wykryte szczepy genotypu T4 wykazywały największe podobieństwo do sekwencji szczepu reprezentującego gatunek *A. lugdunensis*, a T11 – *A. hatchetti*. Zarówno analiza długich, jak i krótkich fragmentów genu ujawniła istnienie jednego wariantu genotypu T11 i czterech wariantów genotypu T4. W przypadku polskich szczepów genotypu „T16”, wyizolowanych od pacjentów i z zachodniopomorskich zbiorników wodnych, analiza fragmentu AMI genu kodującego 18S rRNA wykazała występowanie trzech wariantów genotypu, natomiast analiza fragmentu tego genu o długości ponad 2 kpb – pięciu wariantów. Analiza dłuższego fragmentu genu jedenastu polskich szczepów genotypu „T16” wykazała także obecność wysoce polimorficznego regionu w obrębie sekwencji jednego z wariantów, reprezentowanego przez szczep AM38/T16 wyizolowany od pacjenta z białaczką, czego nie ujawniła analiza fragmentu AMI. Porównanie sekwencji wykazało, że polskie szczepy określone wcześniej jako „T16” odznaczają się największym podobieństwem genetycznym do dwóch szczepów wyizolowanych od padłych ptaków przez zespół badawczy ze Stanów Zjednoczonych i zaklasyfikowanych w 2015 roku jako nowy genotyp T20. W momencie odkrycia, szczepy „T16” z polskich prób klinicznych reprezentowały nowy genotyp i nie były wcześniej izolowane od pacjentów. Ponieważ jednak były one określone jako nowy genotyp na podstawie zbyt krótkiego fragmentu genu kodującego 18S rRNA, a nazwa „T16” została przypisana w 2010 roku innemu, nowemu genotypowi zidentyfikowanemu na podstawie sekwencji genu o długości ponad 2 kpb, należy polskie szczepy określone pierwotnie jako „T16” uznać za genotyp T20 (8).

Wyniki porównania sekwencji reprezentujących genotyp T20 były niejednoznaczne, gdyż szczep AM38/T16 różnił się od innych polskich szczepów tego genotypu maksymalnie o 3,8%, jednak różnica między nim a dwoma szczepami T20 opisanymi w 2015 roku wynosiła 6,5% i 7% (8). Dane literaturowe podają, że różnica powyżej 5% świadczy o odrębnym genotypie, jednak nie jest to sztywna granica i np. w przypadku genotypu T18 uznano go za nowy genotyp na podstawie wyników analizy filogenetycznej mimo, że różnica pomiędzy nim a genotypem T17 wynosiła jedynie 4,3%. Moje badania wykazały, że polskie szczepy genotypu T20 tworzą odrębny kład w obrębie drzewa filogenetycznego i są najbliżej spokrewnione ze szczepami genotypu T20 opisanymi w 2015 roku. Wszystkie pięć polskich wariantów T20 grupowało razem mimo, że cztery warianty wykazywały większe

podobieństwo do dwóch szczepów z bazy danych Banku Genów (różnica 2,5% - 3,3%) niż do piątego z nich reprezentowanego przez szczep AM38/T16 (różnica 3,6% - 3,8%). Pozycja sekwencji genotypów T20 była taka sama również w dendrogramie wykluczającym sekwencję szczepu AM38/T16. Biorąc pod uwagę wyniki zarówno porównania sekwencji, jak i analizy filogenetycznej, uznałam, że wszystkie polskie szczepy wykazujące największe podobieństwo do genotypu T20 opisanego w 2015 roku również reprezentują ten genotyp, jednakże ze względu na wysokie zróżnicowanie genetyczne w jego obrębie i wyraźną odrębność polskich szczepów, należy podzielić go na dwie podgrupy: T20a (dwa szczepy z Banku Genów opisane po raz pierwszy w 2015 roku) i T20b (szczepy polskie), podobnie jak miało to miejsce w przypadku genotypu T2 (8).

Wszystkie oryginalne sekwencje uzyskane przeze mnie zgłosiłam do międzynarodowej bazy danych Banku Genów (GenBank) w celu umożliwienia innym badaczom wykorzystania ich do swoich analiz.

Za moje osiągnięcie uważam:

1. Opracowanie protokołu izolacji DNA z cyst i oocyst pierwotniaków z rodzajów *Cryptosporidium* i *Giardia* oraz metody identyfikacji molekularnej tych pierwotniaków w próbach wody.
2. Adaptację zmodyfikowanej Metody 1623 do wykrywania i genotypowania chorobotwórczych pierwotniaków w środowisku wodnym.
3. Przeprowadzenie po raz pierwszy w Polsce tak dogłębnej analizy możliwości potencjalnego zarażenia pierwotniakami wodnopochodnymi występującymi w naturalnych zbiornikach wodnych województwa zachodniopomorskiego.
4. Wykrycie po raz pierwszy na świecie nowego genotypu T20 *Acanthamoeba* (wcześniej genotyp T16) w środowisku wodnym.
5. Wykrycie po raz pierwszy w Polsce pełzaków z gatunku *Hartmannella vermiformis* w zbiornikach wodnych.
6. Analizę molekularną pierwotniaków z rodzajów *Cryptosporidium* i *Giardia* oraz pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* i gatunku *Hartmannella vermiformis* w naturalnych zbiornikach wodnych województwa zachodniopomorskiego. Pozwoliła ona na określenie, czy pierwotniaki te reprezentują genotypy szczepów charakteryzujących się chorobotwórczością, a w przypadku *Cryptosporidium* i *Giardia* również na identyfikację źródła ich (oo)cyst w zbiornikach wodnych.

7. Przeprowadzenie szczegółowej analizy filogenetycznej pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* na bazie sekwencji fragmentu genu kodującego 18S rRNA o długości 2 kbp, co stanowi wkład w ogólnoswiatową dyskusję dotyczącą systematyki *Acanthamoeba*.

Planuję kontynuację badań pierwotniaków wodnopochoдных. Przeprowadziłam monitoring w zbiornikach wodnych również pierwotniaka *Toxoplasma gondii*, a publikacja opisująca wyniki tych badań jest w trakcie recenzji. Planuję także przeprowadzenie analizy molekularnej tego pierwotniaka oraz wykrytych wcześniej w zbiornikach wodnych pełzaków *H. vermiformis*.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

W 2002 roku rozpoczęłam pracę na stanowisku asystenta w Katedrze Genetyki jako członek zespołu badawczego kierowanego przez prof. Bogumiłę Skotarczak, zajmującego się patogenami przenoszonymi przez kleszcze. Moje pierwsze badania dotyczące tego zagadnienia rozpoczęłam już w trakcie studiów i wykorzystałam w swojej pracy magisterskiej, której promotorem była prof. Bogumiła Skotarczak. Badania te były częścią monitoringu bakterii *Anaplasma phagocytophilum* (wcześniej *Ehrlichia phagocytophila*, czynnik ludzkiej ehrlichiozy granulocytarnej – HGE) w populacjach kleszcza pospolitego *Ixodes ricinus* zbieranych z roślinności, w fazie niepasżytniczej, z różnych terenów Szczecina i okolic. Gatunek *A. phagocytophilum* był rzadziej opisywany w literaturze, zarówno światowej jak i polskiej, niż bakterie z rodzaju *Borrelia*, a badania, w których brałam udział pozwoliły na wypełnienie istniejącej luki w wiedzy na jego temat. Badania te wykazały zróżnicowaną przydatność dwóch zastosowanych par starterów do wykrywania *A. phagocytophilum*, gdyż jedna z nich wykazała się zdecydowanie niższą czułością i specyficznością oraz pozwoliły na wybór odpowiedniego protokołu PCR do dalszych analiz (II.2.1. – 1, 2). Dalsze badania wykazały występowanie *A. phagocytophilum* w kleszczach zebranych z obszarów położonych w bezpośrednim sąsiedztwie terenów zamieszkałych przez człowieka, co świadczyło o ryzyku nabycia zakażenia przez ludzi poprzez kontakt z kleszczami (II.2.1. – 1, 2). Badania ujawniły także sezonowość występowania tej bakterii w ciągu roku (wyższy odsetek zakażenia kleszczy wiosną niż jesienią) (II.2.1. – 1, 2, 3) i jednocześnie brak wahań poziomu średniego zakażenia kleszczy w trzech kolejnych latach

(II.2.1. – 3). Analiza ponad 3000 osobników *I. ricinus* wykazała, że średnie zakażenie imago jest nieco wyższe niż nimf. Z przeprowadzonych badań, a także wcześniejszych prac zespołu Katedry Genetyki oraz dostępnych danych literaturowych wynika również, że stopień zakażenia poszczególnych populacji kleszczy oraz różnych stadiów rozwojowych w obrębie jednej populacji są charakterystyczne dla badanego regionu i powinny być badane każdorazowo dla lokalnych populacji *I. ricinus* (II.2.1. – 3).

Następnym etapem badań biologii i ekologii patogenów odkleszczowych była ich detekcja u żywicieli kleszcza *I. ricinus* (ludzi i psów), którzy mogą cierpieć na choroby odkleszczowe. Diagnostyka takich chorób jest problematyczna, gdyż zwłaszcza na początku infekcji dają one niespecyficzne, grypopodobne objawy, które nie pozwalają na rozpoznanie choroby. Zespół Katedry Genetyki podjął współpracę z Kliniką Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, w ramach grantu celowego zamawianego nr PCZ 014-26 „Doskonalenie metod wykrywania oraz ocena zagrożeń w zakresie chorób odzwierzęcych i skażeń żywności (borelioza u psów i człowieka)”. Głównym celem tych badań było opracowanie opartego na metodach molekularnych protokołu do wykrywania i identyfikacji gatunkowej bakterii z rodzaju *Borrelia* we krwi pacjentów i psów. Użycie metod molekularnych podyktowane było ich wyższą czułością i specyficznością w porównaniu z metodami tradycyjnie stosowanymi do wykrywania patogenów odkleszczowych, takimi jak metody mikroskopowe czy testy serologiczne. Badania, w których brałam udział, wykazały ograniczoną przydatność metod serologicznych do wykrywania boreliozy u psów ze względu na brak korelacji pomiędzy występowaniem objawów choroby a podwyższonym mianem przeciwciał we krwi. Bardziej obiecującą metodą okazało się wykrywanie we krwi DNA bakterii, gdyż w większości przypadków zaobserwowano pozytywną korelację między dodatnim wynikiem PCR a występowaniem objawów boreliozy. Badania wykazały również większą przydatność jako markera genu kodującego 16S rRNA *Borrelia* niż genu *fla* do detekcji DNA tej bakterii we krwi psów. Podobne wyniki uzyskano wcześniej u ludzi (II.1.1. – 3).

Ponieważ odnotowano przypadki występowania koinfekcji kleszczy *I. ricinus* dwoma lub trzema gatunkami patogenów, istniało prawdopodobieństwo występowania zarówno u pacjentów, jaki i u psów chorych lub podejrzanych o boreliozę również innych patogenów odkleszczowych. Uzyskany od ludzi i psów materiał został więc przebadany dodatkowo na obecność DNA innych chorobotwórczych bakterii i pierwotniaków. Spośród 10 osób, u których wykryto we krwi DNA *A. phagocytophilum*, 8 miało zdiagnozowaną boreliozę (w tym u 3 wykryto DNA *Borrelia*), a 4 – odkleszczowe zapalenie mózgu, u żadnego

z pacjentów chorych lub podejrzanych o boreliozę nie wykryto natomiast DNA *Babesia* (II.1.1. – 2). W populacji 192 psów z województwa zachodniopomorskiego ze zdiagnozowaną boreliozą, podejrzanych o boreliozę oraz zdrowych naturalnie eksponowanych na kleszcze, wykryłam DNA *A. phagocytophilum* u 1% osobników oraz DNA *Bartonella* sp. u 0,52% osobników. Nie wykryto natomiast obecności DNA *Babesia* spp. ani *Rickettsia helvetica* u żadnego ze zwierząt. Psy z badanych populacji nie są więc rezerwuarem dla tych patogenów. W przypadku *Babesia*, brak tego pierwotniaka u badanych zwierząt może być związany z brakiem jego naturalnych wektorów na terenie województwa zachodniopomorskiego. Stwierdziłam również współwystępowanie DNA *Bartonella* sp. oraz *Borrelia burgdorferi* sensu lato we krwi psa mającego wcześniej kontakt z kleszczami, co może świadczyć o możliwości przenoszenia bakterii z rodzaju *Bartonella* przez kleszcze. Ten sposób transmisji *Bartonella* jest jednak dyskusyjny i aby go potwierdzić konieczne są dodatkowe badania eksperymentalne (II.1.1. – 1, II.1.2. – 4, II.2.1. – 4).

Kolejnym krokiem podjętym przez Zespół Katedry Genetyki były badania mające na celu poszukiwanie organizmów stanowiących rezerwuar patogenów przenoszonych przez kleszcze. W tym celu nawiązaliśmy współpracę z Zakładem Morfologii Zwierząt Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu i jako gatunki stanowiące potencjalny rezerwuar patogenów odkleszczowych wytypowaliśmy dziko żyjące ptaki i gryzonia, które stanowią żywicieli kleszczy *I. ricinus*. Badane ptaki należały do dziewięciu gatunków w obrębie rzędu Passeriformes i pochodziły z terenów Wielkopolskiego Parku Narodowego. Materiałem badawczym była pobrana od ptaków krew, a także kleszcze zebrane z ptaków oraz z roślinności na terenach ich odławiania. Nie wykryto DNA *A. phagocytophilum* ani pierwotniaków z rodzaju *Babesia* w izolatach z krwi ptaków i zebranych z nich kleszczy, mimo, że poziom infestacji ptaków przez te pasożyty był wysoki. Wykryto natomiast DNA *A. phagocytophilum* u 4.1% kleszczy *I. ricinus* odłowionych z roślinności. Nasze badania wykazały więc, że ptaki nie są rezerwuarem *Babesia*, a także, co wykazały również nieliczne badania innych autorów, *A. phagocytophilum*. Ponieważ wcześniejsze badania zespołu Katedry Genetyki wykluczyły również dziko żyjące gryzonia z grupy organizmów mogących stanowić rezerwuar dla tych patogenów, najbardziej prawdopodobnym rezerwuarem wydawały się więc dziko żyjące przeżuwacze i inne zwierzęta łowne (II.1.1. – 5).

Kontynuacją badań mających na celu określenie gatunków kręgowców stanowiących rezerwuar patogenów odkleszczowych, były badania różnych gatunków zwierząt łownych. Ich wyniki wykorzystałam w swojej pracy doktorskiej, której promotorem była prof. Bogumiła Skotarczak, a badania finansowane były z grantu promotorskiego nr 2P06K 05029

„Zwierzęta łowne jako rezerwuuar patogenów odkleszczowych”, w którym byłam wykonawcą. Moje pilotażowe badania wykazały obecność DNA *A. phagocytophilum* we krwi i tkankach sarny europejskiej (*Capreolus capreolus*) z terenów województwa zachodniopomorskiego oraz u kleszczy *I. ricinus* infestujących te przeżuwacze (II.2.1. – 6, 9, 19), które ze względu na wyższy poziom zakażenia i dłuższy czas bakteriemii niż u gryzoni są bardziej prawdopodobnym rezerwuarem *A. phagocytophilum*. Badając rolę zwierząt łownych jako potencjalnego rezerwuaru patogenów odkleszczowych, zwróciłam uwagę również na bakterie z rodzaju *Bartonella*, które do tej pory były poszukiwane głównie u kotów, psów i gryzoni, a ich wektorowanie przez kleszcze było dyskusyjne. Wykryłam DNA *Bartonella capreoli* i *Bartonella bovis* u saren oraz *Bartonella capreoli* u zebranych ze zwierząt kleszczy *I. ricinus*, a także *Bartonella schoenbuchensis* i *Bartonella bovis* u jeleni szlachetnych (*Cervus elaphus*). Świadczyło to o potencjalnej roli dzikich przeżuwaczy i infestujących je kleszczy w cyklu życiowym *Bartonella*. Moje badania potwierdziły występowanie gatunku *B. bovis*, po raz pierwszy wykrytego u bydła, również u dzikich przeżuwaczy, a także pozwoliły na wykrycie przypadków koinfekcji przeżuwaczy różnymi gatunkami *Bartonella* oraz koinfekcji *Bartonella* spp. i *A. phagocytophilum* (II.1.1. – 4, II.2.1. – 7, 11, 12). Wyniki moich badań wykazały również, że obydwie bakterie najczęściej występowały we krwi, następnie w śledzionie i rzadziej w wątrobie. Materiałem najbardziej przydatnym do wykrywania tych bakterii okazała się krew i śledziona, gdyż DNA patogenów był obecny przynajmniej w jednej z tych prób, w przypadku gdy wykrywany był w wątrobie, natomiast zależności odwrotnej nie zaobserwowałam (II.2.1. – 6, II.1.1. – 4). Wyniki tych badań zostały przedstawione na konferencji międzynarodowej „IX European Multicolloquium of Parasitology” w Hiszpanii oraz na dwóch konferencjach krajowych (w tym jednej o zasięgu międzynarodowym).

Moje dalsze badania mające na celu zbadanie roli trzech gatunków zwierząt łownych: sarny europejskiej, jelenia szlachetnego oraz dzika europejskiego (*Sus scrofa*) jako rezerwuaru patogenów odkleszczowych wykazały, że populacja dzików z terenów Pomorza Zachodniego wykazywała niższą intensywność infestacji przez kleszcza *I. ricinus* (6% osobników) niż populacja saren (44,2%) i jeleni (40%) odstrzelonych na tym samym terenie. Również ekstensywność infestacji była niższa dla dzików (2,3) niż saren i jeleni (odpowiednio 3,6 i 4,4). Wynika to z biologii i trybu życia dzików i może wpływać na ich ograniczoną rolę jako rezerwuaru patogenów odkleszczowych (II.2.2. – 1). Moje badania nad występowaniem DNA *A. phagocytophilum* i *Bartonella* spp. u zwierząt łownych z terenu Pomorza Zachodniego potwierdziły mniejszą rolę dzików niż przeżuwaczy jako

potencjalnego rezerwuaru tych bakterii. DNA *A. phagocytophilum* wykryłam u 45,8% saren, 65% jeleni i 4,8% dzików, natomiast DNA *Bartonella* spp. – u 39% saren i 35% jeleni, nie wykryłam natomiast DNA tej bakterii u dzików. DNA *A. phagocytophilum* wykryłam również u 11,6% kleszczy zebranych z saren, 65% kleszczy zebranych z jeleni i 5,5% kleszczy zebranych z roślinności. DNA *Bartonella* wykryłam natomiast jedynie u 1,9% kleszczy (opite samice) zebranych z saren, u których również stwierdziłam występowanie DNA *Bartonella*. Bakterie te znajdujące się u zebranych z saren kleszczy mogły więc pochodzić z krwi osobników, na których kleszcze żerowały. O ile transmisja przez kleszcze bakterii *A. phagocytophilum* została udowodniona już wcześniej i potwierdzają ją wyniki moich badań, to wyniki te świadczą o braku roli *I. ricinus* jako wektora *Bartonella* na terenie odstrzału zwierząt. Przymusczalnym wektorem *Bartonella* spp. mogą natomiast być inne krwio pijne stawonogi pasożytujące na przeżuwaczach, takie jak *Lipoptena cervi* czy inni przedstawiciele rodziny Hippoboscidae (II.1.2. – 1, 3). Moje kolejne badania wykazały brak specyficzności żywicielskiej *B. schoenbuchensis* i *B. bovis*. Ich wyniki potwierdziły również przydatność regionu międzygenowego ITS jako markera do identyfikacji gatunkowej *Bartonella* oraz analizy filogenetycznej różnych gatunków tych bakterii (II.1.2. – 5). Brałam także udział w badaniach mających na celu ustalenie roli dziko żyjących przeżuwaczy jako rezerwuaru pierwotniaków z rodzajów *Babesia* i *Theileria*. Badania te wykazały, że sarny i jelenie oraz kleszcze *I. ricinus* odgrywają znaczącą rolę w krążeniu i utrzymywaniu *Babesia divergens* i *Theileria* sp. na terenie północno-zachodniej Polski (II.2.1. – 8).

Podjęłam również badania mające na celu stwierdzenie przypadków koinfekcji u różnych gatunków zwierząt łownych oraz u kleszczy *I. ricinus*. Obecność u jednego osobnika różnych gatunków patogenów wiąże się z możliwością ich jednoczesnego występowania także w żerujących na nim kleszczach, co stwarza możliwość podwójnej lub potrójnej infekcji u ludzi mających kontakt z kleszczami. Tego typu infekcje są trudniejsze do diagnozowania i leczenia w porównaniu z pojedynczymi. U badanych saren i jeleni obecnych było 65 przypadków podwójnych i potrójnych koinfekcji, natomiast brak ich było u dzików, prawdopodobnie ze względu na niski odsetek zakażonych zwierząt z tego gatunku. W przypadku podwójnych koinfekcji, obserwowane były przypadki współwystępowania *A. phagocytophilum* z *Bartonella*, *Babesia* lub *Theileria* oraz *Bartonella* z *Babesia* lub *Theileria*. Wykryte potrójne koinfekcje to *A. phagocytophilum* i *Bartonella* razem z *Babesia* lub *Theileria*. Co ciekawe, brak było przypadków koinfekcji z udziałem *Borrelia burgdorferi* sensu lato, mimo obecności pojedynczych zakażeń tą bakterią. Prawdopodobnie jest to związane z niskim odsetkiem występowania *Borrelia* u zwierząt łownych, które nie pełnią roli

jej rezerwuaru. W przypadku kleszczy zebranych zarówno ze zwierząt, jak i z roślinności, obecne były jedynie trzy przypadki podwójnej koinfekcji *A. phagocytophilum* + *Babesia* lub *A. phagocytophilum* + *Theileria*. Kontakt z kleszczami niesie więc niskie ryzyko nabycia mieszanej infekcji, jednakże zakażenie możliwe jest także podczas kontaktu z krwią lub tkankami zwierząt. Ryzyko mieszanych infekcji jest więc bardzo wysokie dla leśników i myśliwych i innych osób zajmujących się oprawianiem upolowanych zwierząt (II.1.2. – 2).

Jednym z potencjalnych gatunków rezerwuarowych dla patogenów odkleszczowych jest koń domowy (*Equus caballus*), dlatego też podjęłam się badań mających na celu zbadanie roli kucy szetlandzkiej w cyklu życiowym tych patogenów. Badania te dotyczyły wykrywania obecności DNA *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Rickettsia* spp. i *A. phagocytophilum* w kleszczach *I. ricinus* zebranych z kucy oraz z roślinności na terenie ich wypasu. Obecność DNA *B. burgdorferi* s.l. została wykryta u 19,2% kleszczy żerujących na kucach i 4,8% kleszczy zebranych z roślinności, *Rickettsia* spp. – u 5,2% i 6,2% kleszczy, a *A. phagocytophilum* – u 1,5% i 1,3% kleszczy. Kuc szetlandzki może więc odgrywać ważną rolę w epidemiologii *B. burgdorferi* s.l. oraz uczestniczyć w cyklu życiowym *Rickettsia* spp. i *A. phagocytophilum* jako żywiciel przenoszących te bakterie kleszczy. Wiedza na temat rozpowszechnienia tych patogenów u kucy i żerujących na nich kleszczy może stanowić wkład w ocenę czynnika nabycia chorób odkleszczowych przez ludzi, zwłaszcza ze względu na bliski kontakt z kucami hodowanymi dla celów rekreacyjnych (II.1.2. – 7). Badania na temat roli różnych gatunków kręgowców i pasożytujących na nich kleszczy *I. ricinus* w cyklu życiowym patogennych bakterii i pierwotniaków są kontynuowane. Obecnie w trakcie recenzji jest praca opisująca moje badania nad obecnością pierwotniaków *Babesia* spp., *Theileria* spp. oraz *Toxoplasma gondii* w tym samym materiale. Przygotowuję również pracę na temat występowania bakterii z rodzaju *Bartonella* u różnych gatunków dzikich zwierząt z terenu Wielkopolskiego Parku Narodowego. Badania te były częściowo finansowane z grantu własnego N N303 372136 "Rola łownych ssaków drapieżnych w krążeniu bakterii *Borrelia burgdorferi* sensu lato i *Bartonella* spp.", w którym byłam wykonawcą. Aktualnie kończę badania nad rolą różnych populacji kleszczy *I. ricinus* w cyklu życiowym *Babesia* spp., *Theileria* spp. i *Toxoplasma gondii* oraz identyfikacją molekularną żywicieli kleszczy, co pomoże w ustaleniu źródła ich zarażenia. Badania te były finansowane z grantu własnego N N303 806140 "Rola kręgowców leśnych w utrzymaniu nie wyspecjalizowanych żywicielsko gatunków kleszczy Ixodidae oraz wektorowanych przez nie gatunków bakterii i pierwotniaków", w którym byłam wykonawcą. Kierownikiem obydwu projektów była dr hab. Beata Wodecka, prof. US. Szczególnie ciekawym wątkiem kontynuowanych przeze

mnie badań jest rola *I. ricinus* w rozprzestrzenianiu w środowisku *T. gondii*, gdyż publikacje dotyczące tego zagadnienia są nieliczne, a pierwotniak ten poszukiwany jest głównie w próbach żywności i wody.

Jestem również autorem lub współautorem rozdziałów w monografiach dotyczących anaplazmozy i babesiozy u ludzi i zwierząt (II.2.1. – 5, 10, II.2.2. – 2), publikacji przeglądowej na temat *Bartonella* spp. jako bakterii przenoszonych przez kleszcze (II.2.2. – 3), a także rozdziałów w monografii pt. „Biologia molekularna patogenów przenoszonych przez kleszcze” dotyczących występowania *A. phagocytophilum* u dzikich przeżuwaczy w województwie zachodniopomorskim (II.2.1. – 13), oraz biologii, diagnostyki, wektora i rezerwuaru bakterii z rodzaju *Bartonella* (II.2.1. – 14-18). Za publikacje poruszające tematykę patogenów odkleszczowych trzykrotnie otrzymałam nagrodę Rektora Uniwersytetu Szczecińskiego za działalność naukową: w 2004 roku Nagrodę Zespołową II stopnia, w 2005 roku Nagrodę Zespołową III stopnia, a w 2009 roku - Nagrodę Indywidualną II stopnia.

Oprócz tematyki patogenów odkleszczowych, podejmowałam również badania dotyczące innych zagadnień. Nawiązałam współpracę z Katedrą i Zakładem Biologii i Parazytologii Medycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, a tematem współpracy była diagnostyka grzyba *Pneumocystis jiroveci* powodującego zapalenie płuc u pacjentów z obniżoną odpornością. Obecność tego patogenu była wykrywana u przedwcześnie urodzonych, intubowanych noworodków z wykluczeniem zarażenia wirusem HIV, w celu zbadania, czy wcześniactwo i intubacja stanowią u nich czynniki ryzyka zarażenia *P. jiroveci*. Badanym materiałem pobieranym od noworodków był materiał pobrany z oskrzeli i płuc, w którym wykryto obecność *P. jiroveci* metodą mikroskopową (u 17,9% noworodków), nie udało się jednak wykryć DNA tego patogenu. Inni autorzy również stwierdzali brak przydatności PCR do wykrywania *P. jiroveci*, nawet u pacjentów HIV-pozytywnych. Przyczyną może być brak możliwości pobrania próby o odpowiedniej objętości i/lub brak opracowanego odpowiedniego protokołu PCR do wykrywania DNA tego patogenu. Do niedawna ludzki patogen *P. jiroveci* uważany był bowiem za szczep gatunku *Pneumocystis carinii*, ponadto niemożliwa jest transmisja gatunku zwierzęcego do organizmu człowieka. Dane z literatury wykazywały jednak, że do wykrywania obydwu gatunków ciągle wykorzystywany był ten sam protokół PCR. Detekcja *P. jiroveci* za pomocą PCR wymaga więc przeprowadzenia badań w celu opracowania odpowiedniej metodyki (II.1.1. – 6).

Współpraca z Katedrą i Zakładem Biologii i Parazytologii Medycznej PUM w Szczecinie dotyczyła także detekcji patogenów wodnopochoodnych w zbiornikach wodnych województwa zachodniopomorskiego, co stanowi tematykę mojego osiągnięcia naukowego.

Oprócz monitoringu tych patogenów w naturalnych zbiornikach wodnych, brałam udział również w badaniach zbiorników sztucznych użytkowanych przez człowieka, takich jak baseny pływackie, fontanny, baseny przeciwpożarowe oraz sieć wodociągowa. Z prób wody wyizolowanych zostało 8 szczepów termofilnych, których genotypowanie wykazało, że należą one do gatunku *H. vermiformis* lub rodzaju *Acanthamoeba* (genotypy T4, T11 i „T16” - obecnie T20). Genotypy o ustalonej patogenności (T4 i T11) zostały wykryte w fontannie oraz dwóch krytych basenach, co stwarza zagrożenie dla osób mających kontakt z wodą z tych zbiorników, gdyż również wdychanie aerozolu wodnego unoszącego się wokół fontanny i zawierającego trofozoity pełzaków może doprowadzić do zarażenia. Szczepy reprezentujące genotyp T20, którego potencjału chorobotwórczego nie potwierdzono, lecz jest on możliwy, były obecne w dwóch basenach pływackich, w tym jednym przeznaczonym dla dzieci, co stwarza szczególne zagrożenie ze względu na ich niższą odporność. Drugi z basenów zawierał wodę o wysokim stopniu zasolenia, co świadczy o wysokiej odporności pełzaków na ten czynnik zewnętrzny. Obecność *H. vermiformis*, gatunku o dyskusyjnej patogenności, została stwierdzona w basenie przeciwpożarowym, ale także w fontannie w centrum handlowym i w wodzie kranowej pochodzącej ze szpitalnej sieci wodociągowej (II.1.2. – 6). Oprócz prac oryginalnych dotyczących chorobotwórczych pierwotniaków wodnopochoďnych, mój dorobek obejmuje również współautorstwo publikacji przeglądowej dotyczącej biologii, epidemiologii i diagnostyki tych patogenów (II.2.2. – 4).

Małgorzata Adamska

