

dr Agnieszka Perec-Matysiak

AUTOREFERAT

**Zakład Parazytologii
Instytut Genetyki i Mikrobiologii
Wydział Nauk Biologicznych
Uniwersytet Wrocławski**

Wrocław 2019

1. Imię i nazwisko

Agnieszka Perec-Matysiak

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

- **2004** doktor nauk biologicznych w zakresie biologii; Wydział Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego; praca doktorska pt.: „Udział antygenów nicieni *Syphacia obvelata* (Oxyuridae) w powstawaniu odpowiedzi immunologicznej u myszy laboratoryjnej (szczep BALB/c)” wykonana w Zakładzie Parazytologii Instytutu Genetyki i Mikrobiologii, promotor prof. dr hab. Anna Okulewicz
- **2000** magister biologii, specjalność mikrobiologia; Wydział Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego; praca magisterska pt.: „Charakterystyka antygenów przedstawicieli nadrodziny Trichinelloidea Hall, 1916 (Nematoda)” wykonana w Zakładzie Parazytologii Instytutu Genetyki i Mikrobiologii, promotor prof. dr hab. Anna Okulewicz
- **1998** licencjat; Wydział Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego; praca licencjacka pt.: „Zastosowanie badań immunologicznych w parazytologii” wykonana w Zakładzie Parazytologii Instytutu Genetyki i Mikrobiologii, promotor dr Barbara Błaszczuk

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- **od 16.02.2006 do chwili obecnej** - adiunkt w Zakładzie Parazytologii Instytutu Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski
- **16.02.2005 - 15.02.2006** - asystent w Zakładzie Parazytologii Instytutu Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski
- Urlopy macierzyńskie i wychowawcze: lipiec 2007 - listopad 2007; kwiecień 2009 – styczeń 2010

4. Opis merytoryczny osiągnięcia naukowego przedstawionego do oceny

wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2018 r. poz. 1789).

A. Tytuł osiągnięcia naukowego

**Dziko żyjące zwierzęta jako rezerwuár zoonotycznych gatunków
mikrosporydiów i kryptosporydiów**

B. Spis publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Cykl prac stanowiący osiągnięcie naukowe obejmuje 6 publikacji, które powstały w latach 2015-2019. **Sumaryczny IF** tych prac wynosi **10,819**, a liczba punktów MNiSW **150**. Wartości IF oraz punkty MNiSW podano zgodnie z rokiem opublikowania. Dla artykułów opublikowanych od roku 2017 przyjęto ostatnią dostępną punktację z dnia 25 stycznia 2017.

- P1. Perec-Matysiak A.**, Buńkowska-Gawlik K., Kváč M., Sak B., Hildebrand J., Leśniańska K. 2015. Diversity of *Enterocytozoon bieneusi* genotypes among small rodents in southwestern Poland. *Veterinary Parasitology*, 214: 242–246.
[IF: 2,242; MNiSW: 40]
- P2. Perec-Matysiak A.**, Leśniańska K., Buńkowska-Gawlik K., Čondlová Š, Sak B., Kváč M., Rajskeý D., Hildebrand J. 2019. The opportunistic pathogen *Encephalitozoon cuniculi* in wild living Murinae and Arvicolinae in Central Europe. *European Journal of Protistology*, 69: 14-19.
[IF: 2,430; MNiSW: 20]
- P3. Perec-Matysiak A.**, Buńkowska-Gawlik K., Zaleśny G., Hildebrand J. 2015. Small rodents as reservoirs of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in the area of south-western Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 22: 1–5.
[IF: 1,126; MNiSW: 20]
- P4. Leśniańska K.**, **Perec-Matysiak A.**, Hildebrand J., Buńkowska-Gawlik K., Piróg A., Popiołek M. 2016. *Cryptosporidium* spp. and *Enterocytozoon bieneusi* in introduced raccoons (*Procyon lotor*)—first evidence from Poland and Germany. *Parasitology Research*, 115: 4535-4541.
[IF: 2,329; MNiSW: 30]

P5. Perec-Matysiak A., Wesołowska M., Leśniańska K., Buńkowska-Gawlik K., Hildebrand J., Kicia M. 2017. Survey for zoonotic microsporidian pathogens in wild living urban rooks (*Corvus frugilegus*). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 64: 721-724.

[IF: 2,692; MNiSW: 25]

P6. Leśniańska K., Perec-Matysiak A. 2017. Wildlife as an environmental reservoir of *Enterocytozoon bieneusi* (Microsporidia) – analyses of data based on molecular methods. *Annals of Parasitology*, 63: 265–281.

[MNiSW: 15]

C. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników:

Wprowadzenie i cel naukowy badań

Moje osiągnięcie naukowe składa się z sześciu prac (w tym pięciu prac oryginalnych oraz jednej przeglądowej), w których jestem pierwszym i/lub korespondencyjnym autorem. Prezentowane badania dostarczają nowych danych na temat roli dziko żyjących zwierząt jako środowiskowych rezerwuarów mikropasożytów, w tym mikrosporydiów, grupy wykazującej pokrewieństwo z grzybami (Fungi) oraz pierwotniaków należących do rodzaju *Cryptosporidium* (Apicomplexa). Grupa badanych mikropasożytów, choć niejednorodna pod względem taksonomicznym, morfologicznym i genetycznym, charakteryzuje się zdolnością do wywoływania inwazji, często mających podłoże zoonotyczne, u szerokiej gamy żywicieli o zróżnicowanym statusie immunologicznym.

Microsporidia to obligatoryjne pasożyty wewnątrzkomórkowe występujące u ludzi i zwierząt (Dider i Weiss 2011). W oparciu o molekularną analizę filogenetyczną stwierdzono, że wykazują one silne pokrewieństwo z grzybami (Fungi) (James i wsp. 2013). Występują w postaci jednokomórkowych spor, które są wydalane wraz z kałem, moczem lub plwociną zarażonych żywicieli. Do zarażenia dochodzi najczęściej na drodze pokarmowej, poprzez spożycie wody lub żywności zanieczyszczonej sporami, rzadziej poprzez inhalację spor wraz z kurzem. Ze względu na szeroki rezerwuar zoonotyczny oraz dużą odporność na działanie czynników środowiskowych, spory tych patogenów są szeroko rozpowszechnione w środowisku. Spośród mikrosporydiów największe znaczenie kliniczne dla człowieka mają *Encephalitozoon* spp. i *Enterocytozoon bieneusi*.

Enterocytozoon bieneusi jest identyfikowany u wielu gatunków zwierząt domowych i dzikich, głównie ssaków i niektórych ptaków (Santin i Fayer 2011; Guo i wsp. 2014). *E. bieneusi* lokalizuje się głównie w enterocytach jelita cienkiego, rzadziej w przewodzie żółciowym i wątrobie, sporadycznie powoduje inwazje rozsiane (Didier 2005). Drogi transmisji *E. bieneusi*,

swoistość żywicielska i potencjał zoonotyczny tych patogenów, jako nie do końca poznane, pozostają tematem wielu prac badawczych (Santin i Fayer 2011). Analiza sekwencji opartych w wyniku amplifikacji fragmentu ITS (ang. internal transcribed spacer) jest szeroko stosowana w molekularnych badaniach epidemiologicznych dotyczących występowania *E. bieneusi* u ludzi i zwierząt. Obecnie, w oparciu o wysoki stopień zróżnicowania fragmentu ITS, dla *E. bieneusi* opisanych zostało ponad 300 genotypów. Przeprowadzone analizy pozwoliły na wyodrębnienie dziesięciu grup genotypowych (Thellier i Breton 2008; Karim i wsp. 2015), z których grupa 1 zawiera większość genotypów zidentyfikowanych u ludzi. Ze względu na możliwość transmisji pomiędzy ludźmi a zwierzętami uważana jest za grupę o potencjale zoonotycznym. W odróżnieniu od niej, pozostałe grupy zawierają genotypy żywicielsko specyficzne, wykrywane u poszczególnych żywicieli zwierzęcych. Jednocześnie ostatnio obserwuje się, że niektóre genotypy wykrywane u ludzi wykazują podobieństwo z genotypami grup 2-7, przez co coraz częściej sugeruje się, że grupa 1 powoli traci swoje zoonotyczne znaczenie.

W obrębie rodzaju *Encephalitozoon* wyróżniamy trzy gatunki – *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon intestinalis* i *Encephalitozoon hellem*, których inwazje u zwierząt zazwyczaj mają charakter rozsiany (Didier i wsp. 2004). Techniki molekularne oparte na analizie regionu kodującego ITS *Encephalitozoon* spp. potwierdziły obecność wielu różnych genotypów w obrębie tego rodzaju identyfikowanych u ludzi oraz wielu gatunków zwierząt (Hinney i wsp. 2016). Wraz z rosnącą świadomością związaną z udziałem dzikich zwierząt jako źródła mikrosporydiozy ludzi oraz zwierząt hodowlanych i towarzyszących, rośnie liczba prac poświęconych temu zagadnieniu.

Pierwotniaki z rodzaju *Cryptosporidium* pasożytują w komórkach nabłonkowych, głównie przewodu pokarmowego, u szerokiej gamy kręgowców, w tym ludzi (Ryan i Xiao 2014). Dotychczas opisano i scharakteryzowano 38 gatunków należących do rodzaju *Cryptosporidium* oraz dziesiątki genotypów, wykazujących duże zróżnicowanie w odniesieniu do specyficzności względem konkretnych żywicieli (Feng i wsp. 2018). Początkowe różnicowanie gatunków *Cryptosporidium* spp. następowało w oparciu o morfometrię oocyst, co w świetle aktualnej wiedzy wydaje się bardzo wątpliwe (Xiao i wsp. 2004). Najwięcej korzyści diagnostycznych w postaci nowo wyodrębnionych gatunków *Cryptosporidium* oraz określeniu ich specyficzności żywicielskiej przyniosła amplifikacja genu kodującego małą podjednostkę rybosomu 18S rRNA (Xiao i wsp. 1999). Okazało się także, że genotypowanie oraz analizy filogenetyczne przeprowadzone tylko w oparciu o powyższy marker molekularny, doprowadziły w wielu przypadkach do niejednoznacznej identyfikacji tego pierwotniaka. Zatem do precyzyjnej identyfikacji gatunków/genotypów *Cryptosporidium* spp. zaleca się obecnie wielomarkerową analizę obejmującą równocześnie różne regiony DNA, takie jak geny kodujące białko ściany oocysty (COWP), aktyne, czy białka szoku cieplnego HSP70. Analiza dodatkowych markerów jak

np. gp60 (glikoproteiny 60kDa) jest niezbędna do wyodrębnienia subgenotypów *Cryptosporidium* spp. (Thompson i Ash 2016). Najczęściej zarażenie *Cryptosporidium* spp. następuje na drodze fekalno-oralnej poprzez spożycie oocyst pierwotniaka, a w nielicznych przypadkach także na drodze wziewnej (Fayer i wsp. 2000). Wśród potencjalnych dróg transmisji *Cryptosporidium* spp. można wymienić transmisję zoonotyczną, gdyż za największy rezerwuuar *Cryptosporidium* spp. w środowisku uważa się zwierzęta dziko żyjące oraz gospodarskie wydalające do środowiska ogromne liczby oocyst. Uważa się, że genotypy pochodzące od zwierząt dzikich są coraz częściej uznawane za istotne źródło inwazji *Cryptosporidium* spp. u ludzi (Stenger i wsp. 2015). Biorąc pod uwagę, że ponad 75% ludzkich przypadków kryptosporydiozy ma charakter zoonotyczny, badania dotyczące dziko żyjących żywicieli jako rezerwuuarów tego pasożyta są uzasadnione.

Za środowiskowy rezerwuuar mikropasożytów jelitowych tj. mikrosporydiów *Enterocytozoon bieneusi* i *Encephalitozoon* spp. oraz pierwotniaków z rodzaju *Cryptosporidium* uważa się zwierzęta domowe i hodowlane oraz dziko żyjące przebywające w pobliżu siedzib ludzkich, wydalające do gleby i wody formy dyspersyjne (oocysty bądź spory), które są zdolne do zrażania nowego żywiciela, w tym człowieka. W związku z powyższym, inwazje wywoływane przez te pasożyty bardzo często mają podłoże zoonotyczne. Pomimo że obecnie obserwuje się wzrost zainteresowania patogenami i pasożytami występującymi u zwierząt dziko żyjących, to jednak badania te podejmowane są wciąż stosunkowo rzadko. Prawdopodobnie wynika to głównie z trudności w pozyskiwaniu unikalnych próbek biologicznych od dziko żyjących zwierząt. Jest to zadanie pracochłonne i wymagające uprzedniego pozyskania odpowiednich zgód komisji etycznych i środowiskowych, a także zaangażowania całego zespołu badawczego. Dodatkowo badania prowadzone na dziko żyjących gryzoniach czy ptakach nie są powszechne ze względu na brak znaczenia ekonomicznego tych zwierząt. Badania własne prowadzone w Zakładzie Parazytologii Uniwersytetu Wrocławskiego potwierdziły obecność gatunków i genotypów wyżej wymienionych mikropasożytów w rezerwuarach zwierzęcych. Dane pojawiające się ostatnimi laty w literaturze przedmiotu umożliwiły interpretację oraz dyskusję otrzymanych wyników, które prezentowane są w przedłożonym osiągnięciu habilitacyjnym.

Celem badań, będących przedmiotem niniejszej rozprawy habilitacyjnej, było:

1. Wykazanie roli dziko żyjących gryzoni z podrodzin Murinae (myszarka polna *Apodemus agrarius*, myszarka leśna *Apodemus flavicollis*, myszarka zaroślowa *Apodemus sylvaticus*, mysz domowa *Mus musculus*) i Arvicolinae (nornica ruda *Myodes glareolus*) jako rezerwuaru środowiskowego dla *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon* spp. oraz *Cryptosporidium* spp.;
2. Identyfikacja mikropasożytów jelitowych u wybranych zwierząt dziko żyjących, w tym gatunku introdukowanego oraz ptaków występujących na terenach miejskich;

3. Określenie potencjału zoonotycznego stwierdzonych gatunków i genotypów *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon* spp. i *Cryptosporidium* spp.

Badania obejmowały zarówno ocenę prewalencji mikropasożytów jak i ich analizę filogenetyczną. Materiał biologiczny stanowiły próbki kału oraz śluz (P1 i P2) lub kału (P3, P4, P5). W celu detekcji oraz identyfikacji mikropasożytów stosowano metody molekularne. Całkowite DNA izolowano za pomocą komercyjnie dostępnych zestawów po uprzedniej homogenizacji mechanicznej materiału. Wyizolowane DNA przechowywano w temperaturze -20°C. Detekcja badanych mikropasożytów przeprowadzona została w oparciu o metodę nested-PCR, z zastosowaniem swoistych gatunkowo i/lub rodzajowo par starterów. W przypadku *Cryptosporidium* spp. użyto następujących markerów molekularnych: fragmentu genu 18S rRNA oraz fragmentów genów kodujących białko ściany oocysty (COWP) i aktynę. Do identyfikacji mikrosporidiów, *E. bieneusi* i *Encephalitozoon* spp., wykorzystano fragment genu kodującego region ITS rRNA. Sekwencjonowanie większości otrzymanych produktów PCR było niezbędne ze względu na fakt, iż badane mikropasożyty charakteryzują się wyjątkowo dużym zróżnicowaniem genetycznym. Następnie przeprowadzono analizy sekwencji oraz analizy filogenetyczne, które umożliwiły uzyskanie informacji dotyczących charakteru wykrywanych patogenów oraz ich potencjału zoonotycznego.

Osiągnięcie naukowe

P1. Perec-Matysiak A., Buńkowska-Gawlik K., Kváč M., Sak B., Hildebrand J., Leśniańska K. 2015. **Diversity of *Enterocytozoon bieneusi* genotypes among small rodents in southwestern Poland.** Veterinary Parasitology, 214: 242–246.

P2. Perec-Matysiak A., Leśniańska K., Buńkowska-Gawlik K., Čondlová Š, Sak B., Kváč M., Rajský D., Hildebrand J. 2019. **The opportunistic pathogen *Encephalitozoon cuniculi* in wild living Murinae and Arvicolinae in Central Europe.** European Journal of Protistology, 69: 14-19.

Pierwsze dwie prace z cyklu tworzącego osiągnięcie habilitacyjne (**P1 i P2**) związane były z badaniami nad mikrosporydiami występującymi u dziko żyjących gryzoni, które ze względu na swoistą biologię i behavior, można uznać za zwierzęcy rezerwuar różnych gatunków mikrosporydii. Ze względu na fakt, że gryzonie są często spotykane na obszarach naturalnych bądź o zmniejszonej antropopresji, tak jak i na obszarach wiejskich czy podmiejskich, mają one możliwość kontaktu z innymi dzikimi zwierzętami, ale także zwierzętami hodowanymi oraz ludźmi, a tym samym mogą przyczyniać się do szerzenia inwazji. Chociaż zróżnicowanie w obrębie genotypów *Enterocytozoon bieneusi* u ssaków było przedmiotem wcześniejszych badań, to wiedza na temat obecności tego patogenu w populacjach dzikich gryzoni pozostawała niekompletna i

dotyczyła jedynie detekcji i charakterystyki tego patogenu u myszy domowej (*M. musculus*) odławianej z terenu Czech (Sak i wsp. 2011) oraz odławianych w USA myszaków (*Peromyscus* spp.) i nornikowatych (*Myodes gapperi* i *Microtus pennsylvanicus*) (Guo i wsp. 2014). W związku z tym celem moich badań było ustalenie, czy gryzonie należące do podrodzin Murinae (*Apodemus agrarius*, *Apodemus flavicollis* i *Mus musculus*) i Arvicolinae (*Myodes glareolus*) mogą pełnić rolę żywicieli rezerwuarowych w stosunku do *E. bieneusi* i tym samym przyczyniać się do rozprzestrzeniania spor tego gatunku mikrosporydium w środowisku (**P1**). Badaniom zostały poddane próbki kału i śledziony gryzoni odławianych z terenu Dolnego Śląska. Z uwagi na dostępność próbek śledziony pozyskanych w czasie sekcji od gryzoni, przeanalizowano możliwość inwazji rozsianej w przypadku *E. bieneusi*. Przy użyciu reakcji nested-PCR wyznaczono ogólną prewalencję *E. bieneusi* na poziomie 38,9% oraz oddzielnie w dwóch typach materiału, próbkach kału i śledziony wynoszącą odpowiednio 51,3% oraz 14,3%. Najwyższą częstość zarażenia zanotowano u *A. agrarius* i *M. glareolus*. Sekwencje nukleotydowe kodujące region ITS rRNA *E. bieneusi* pozyskane ze wszystkich badanych gatunków żywicielskich poddano analizie, w wyniku której zidentyfikowano 12 genotypów, w tym patogenny genotyp D (najczęściej identyfikowany, 33% izolatów), genotyp gorilla 1 i dziesięć nowych genotypów specyficznych dla badanych gryzoni - nazwanych WR1-WR10. Przeprowadzona analiza filogenetyczna pokazała ułożenie się części uzyskanych sekwencji wśród genotypów grupy 1, skupiającej genotypy o potencjale zoonotycznym. Genotypy WR1-WR4 okazały się być genetycznie zbliżone z tymi zidentyfikowanymi u ludzi i innych gatunków zwierząt. Analiza filogenetyczna wykazała, że nowy genotyp WR1 jest w 99,5% podobny do genotypu gorilla 1. Genotypy WR2-WR4 są genetycznie odmienne od znanych genotypów i są najbliższe (98,7-99,5% podobieństwa) genotypowi D. Genotypy WR5 i WR6 weszły w skład grupy 2 zawierającej wcześniej tzw. bydło-specyficzne genotypy BEB. Uzyskane przeze mnie wyniki pokazują, że swoistość żywicielska w tej grupie jest szersza niż wcześniej opisywano, gdyż genotypy BEB oprócz bydła wykrywane były także u ludzi, naczelnych, owiec i niektórych ptaków (Fayer i wsp. 2007; Pirestani i wsp. 2013; Karim i wsp. 2014). Podczas badań własnych zidentyfikowano również genotypy WR7-WR10, prawdopodobnie typowo gryzoniowo-specyficzne, zorganizowane w osobnym kładzie. **Analiza molekularna zidentyfikowanych genotypów w oparciu o sekwencje ITS podkreśla kompleksowość *E. bieneusi* i szczególną zdolność tego pasożyta do adaptacji i rozwoju u różnych żywicieli.** Do oceny potencjału zoonotycznego oraz ryzyka transmisji niezbędna jest zatem identyfikacja molekularna genotypów tego gatunku mikrosporydium. W przypadku preferencji patogenu odnośnie występowania w badanej tkance (tropizmu tkankowego), częściej stwierdzałam *E. bieneusi* w próbkach kału niż śledziony. Chociaż w przypadku *E. bieneusi* możliwość inwazji rozsianej jest rzadka, to jednak inna niż typowo jelitowa lokalizacja tego pasożyta jest również prawdopodobna.

Jako że nie wiadomo, czy same spory tego mikrosporydium były obecne w śledzione, to wydaje się, że występowanie DNA *E. bieneusi* w próbkach śledziony można wytłumaczyć jako skutek fagocytozy spor, w szczególności przez makrofagi (Franzen i wsp. 2005). **Badania opisane w publikacji oznaczonej jako P1 po raz pierwszy donoszą o występowaniu *E. bieneusi* u dziko żyjących gryzoni z rodzajów *Apodemus* i *Myodes* w Europie.**

Większość istniejących badań nad *Encephalitozoon* spp. dotyczy występowania tego mikrosporydium u ludzi i zwierząt domowych, natomiast niewiele prac odnosi się do dziko żyjących zwierząt, w tym gryzoni, które mogą stanowić potencjalny rezerwuuar tego pasożyta w środowisku. Badania ograniczone były jak dotąd do gryzoni odławianych z terenu Austrii, Słowacji, terenów z pogranicza czesko-niemieckiego i Japonii (Fuehrer i wsp. 2010; Sak i wsp. 2011; Tsukada i wsp. 2013; Danišová i wsp. 2015). Celem podjętych przez mnie badań było wykazanie obecności *Encephalitozoon* spp. u dziko żyjących gatunków myszarek i norników, powszechnie występujących w Europie Środkowej, które nie były obiektem wcześniejszych badań (**P2**). W opraciu o metodę nested-PCR, wyznaczono ogólną prewalencję mikrosporydiów na poziomie 15,1%. Jedynym zidentyfikowanym gatunkiem okazał się *Encephalitozoon cuniculi*, który u badanych żywicieli został zanotowany po raz pierwszy, przy czym najwyższą częstość zarażenia odnotowano u *A. flavicollis* (18,1%), a najniższą u *M. glareolus* (4,4%). Wyższą prewalencję *Enc. cuniculi* zaobserwowano w próbkach kału (14%) niż śledziony (6%) zarażonych gryzoni. **Analiza sekwencji ITS wykazała, że najczęściej występował *Enc. cuniculi* genotyp II (92,5%), który zanotowany został u badanych gatunków z rodzaju *Apodemus*.** W wyniku badań własnych zidentyfikowałam również *Enc. cuniculi* genotyp I (1,5%) u *M. glareolus* i *Enc. cuniculi* genotyp III (6,0%) u *A. agrarius*. Analiza dostępnej literatury wskazuje, że początkowo genotypy *Enc. cuniculi* wydawały się wykazywać preferencje regionu geograficznego, jak i gatunku żywiciela, lecz z biegiem czasu te same genotypy zaczynały być notowane u rozmaitych żywicieli z różnych obszarów geograficznych (Fayer i Santin-Duran 2014). Chociaż wszystkie genotypy *Enc. cuniculi* uważane są jako zoonotyczne, ludzie najczęściej zarażeni są genotypem *Enc. cuniculi* II (Sokolova i wsp. 2011). Wyniki badań własnych potwierdzają, że *Enc. cuniculi* genotyp III wydaje się być rzadko rozpoznawany u gryzoni. Wbrew oczekiwaniom, w trakcie badań nie wykryłam *Enc. hellem* w żadnej z próbek gryzoni odławianych na terenie rezerwatu ornitologicznego. Można byłoby oczekiwać, że obecność ptactwa wodnego i innych ptaków, które to uważane są za głównych żywicieli tego gatunku mikrosporydium, zwiększy ryzyko inwazji *Enc. hellem* u gryzoni. **Uzyskane wyniki pokazują, że dziko żyjące gryzonie z podrodziny Murinae i Arvicolinae przyczyniają się do rozprzestrzeniania w środowisku spor mikrosporydiów *E. bieneusi* i *Enc. cuniculi*, które stanowić mogą zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt.**

P3. Percec-Matysiak A., Buńkowska-Gawlik K., Zaleśny G., Hildebrand J. 2015. Small rodents as reservoirs of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in the area of south-western Poland. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 22: 1–5.

Badania nad filogenezą i biologią *Cryptosporidium* spp. wykazały duże zróżnicowanie specyficzności względem konkretnych żywicieli (Ryan i Xiao 2014). Najmniej uwagi, jako ich żywicielom, poświęcono dotychczas dzikim zwierzętom, w tym gryzoniom. Ten najbardziej zróżnicowany i zawierający aż 40% gatunków zajmujących wiele różnych siedlisk, rząd ssaków, uważany jest za istotny rezerwuuar tych pasożytów w środowisku. Gryzonie przyczyniają się do zanieczyszczenia wody, gleby i żywności oocystami tego pierwotniaka stwarzając tym samym zagrożenie dla zdrowia publicznego (Xiao i Feng 2008). Dotychczasowe badania wykazały, że gryzonie są głównie zarażone przez specyficzne dla siebie gatunki i genotypy *Cryptosporidium* spp., chociaż gatunki zoonotyczne *C. parvum* i *C. ubiquitum*, czy też specyficzne dla zwierząt hodowlanych *C. scrofa*um, *C. andersoni* i *C. baileyi*, też są u nich notowane (Horčíčková i wsp. 2018). Wśród gryzoni z rodzaju *Apodemus* zidentyfikowano dodatkowo gatunki *Cryptosporidium*, które wykazują specyficzność wobec innych żywicieli np. *C. hominis*, *C. muris*, *C. suis*, *Cryptosporidium* genotyp I i II, oraz *Cryptosporidium* genotyp Naruko. Čondlová i wsp. (2018) opisali niedawno *Cryptosporidium apodemi* i *Cryptosporidium ditrichi* u gryzoni z rodzaju *Apodemus* wykazując specyficzność żywicielską tych gatunków względem gryzoni. Z kolei nornikowate mogą być specyficznym żywicielem dla około 20 różnych nieinwazyjnych dla ludzi gatunków/genotypów kryptosporydiów, natomiast rzadko wydają się być zarażone *C. parvum* (Stenger i wsp. 2018). W Polsce wcześniejsze badania, wykazały obecność tych pierwotniaków u dziko żyjących gryzoni z obszaru Pojezierza Mazurskiego (Bajer i wsp. 2002; Bajer i wsp. 2003; Bajer 2008) i Wielkopolski (Solarczyk i Majewska 2007). Dodatkowo w nielicznych badaniach przeprowadzono identyfikację molekularną tych pasożytów. W związku z powyższym, celem badań własnych (P3) było określenie roli wolno żyjących gryzoni jako rezerwuaru *Cryptosporidium* spp. na obszarze południowo-zachodniej Polski w środowiskach o zróżnicowanej antropopresji. Próbkę kału gryzoni analizowane były mikroskopowo (barwienie przy użyciu zmodyfikowanej metody Ziehl-Neelsena, test immunofluorescencji bezpośredniej Merifluor® *Cryptosporidium/Giardia*). Dodatkowo w celu identyfikacji gatunków lub genotypów pierwotniaka, przeprowadzono wstępne badania molekularne. W wyniku przeprowadzonych badań wykazałam, że prewalencja *Cryptosporidium* spp. u badanych gatunków wynosiła do 68,3%. Prewalencja pasożytów obserwowana u gryzoni odławianych z terenów wchodzących w skład Aglomeracji Wrocławskiej była wyższa niż na terenach wiejskich. W czasie badań nie zanotowano istotnych różnic w zarażeniu tym pierwotniakiem pomiędzy poszczególnymi gatunkami gryzoni, natomiast uwzględniając płeć gryzoni wykazano, że znacznie częściej zarażone *Cryptosporidium*

spp. były samce nornicy rudej. Porównywalne wartości prewalencji notowane były u gryzoni z Pojezierza Mazurskiego i wskazywały na wyższą prewalencję *Cryptosporidium* spp. u nornikowatych niż u przedstawicieli myszowatych (Bajer i wsp. 2001). Dane literaturowe pokazują, że na prewalencję *Cryptosporidium* mogą wpływać takie czynniki jak wiek żywiciela, sezon, gęstość populacji, lokalizacja odłowów, pogoda, klimat, dieta gryzoni oraz konsumpcja wody (Nichols i wsp. 2014). Przeprowadzone w badaniach własnych analizy molekularne, w oparciu o sekwencje COWP, wykazały, że izolat pozyskany z *A. agrarius* został zidentyfikowany jako *C. parvum*, a jego sekwencja była identyczna z tymi występującymi u ludzi. **Jest to pierwsze doniesienie dotyczące występowania tego zoonotycznego gatunku kryptosporydium u myszarki polnej, która będąc gryzoniem synantropijnym, o podobnym behawiorze do myszy domowej, może stanowić środowiskowy rezerwuuar tego pierwotniaka dla człowieka.** Badania innych autorów, wskazały na występowanie *Cryptosporidium parvum* genotypu mysiego I u nornicy rudej, nornika zwyczajnego i myszarki leśnej z obszaru północno-wschodniej Polski (Bajer i wsp. 2003) oraz *C. muris* u myszarki polnej i nornika zwyczajnego z terenu Wielkopolski (Solarczyk i Majewska 2007). Podczas badań własnych wykryto u wszystkich trzech badanych gatunków gryzoni również inny gatunek kryptosporydium. W oparciu o analizę fragmentu sekwencji genu dla 18S rRNA zidentyfikowany on został jako *Cryptosporidium ubiquitum*. Gatunek ten, wcześniej znany jako „cervine genotype”, występujący u jeleniowatych, odnotowany także został w kale ludzi i zwierząt (Feng i wsp. 2007). **Rezultatem badań własnych jest pierwsze doniesienie dotyczące występowania *C. ubiquitum* u badanych gatunków dzikich gryzoni.** Ponato u badanych gryzoni z terenu Dolnego Śląska zanotowano również występowanie pierwotniaków z rodzaju *Giardia*, a analiza uzyskanych sekwencji wykazała obecność specyficznych dla gryzoni gatunków *G. muris* oraz *G. microti*.

P4. Leśniańska K., **Perec-Matysiak A.**, Hildebrand J., Buńkowska-Gawlik K., Piróg A., Popiołek M. 2016. ***Cryptosporidium* spp. and *Enterocytozoon bieneusi* in introduced raccoons (*Procyon lotor*)—first evidence from Poland and Germany.** Parasitology Research, 115: 4535-4541.

Innym obiektem moich badań w odniesieniu do zwierząt dziko żyjących jako środowiskowych rezerwuarów omawianych mikropasożytów był szop pracz (*Procyon lotor*) (**P4**). Szop jest gatunkiem rodzimym w faunie Ameryki Północnej. Sprowadzony do Niemiec w celach hodowlanych, w czasie II wojny światowej został wypuszczony tworząc dziko żyjącą populację, szybko rozprzestrzeniającą się na teren Europy Zachodniej i Centralnej, w tym także Polski (Bartoszewicz i wsp. 2008). Obecność szopów w pobliżu siedzib ludzkich może stwarzać zagrożenie dla zdrowia i życia człowieka, bowiem jak wykazały badania prowadzone na terenie

USA, drapieżnik ten jest żywicielem wielu patogennych, nie tylko dla człowieka, ale także zwierząt domowych i dzikich, gatunków pasożytów i patogenów (Beltrán-Beck i wsp. 2012). Uważa się, że gatunki wprowadzone do nowego środowiska często tracą swoje własne pasożyty w trakcie tworzenia nowej populacji, o czym mówi „Hipoteza Uwolnienia od Wroga” (ERH), ale także nabywają i gromadzą pasożyty obecne na nowo kolonizowanych obszarach (Torchin i Mitchell 2004). Ponadto może istnieć znaczące prawdopodobieństwo, że szopy przekażą swoje rodzime gatunki pasożytów na tereny kolonizowane. Dotychczasowe badania szopów introdukowanych na obszar Europy skoncentrowane były przede wszystkim na identyfikacji pierwotniaków tj. *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* sp. i *Eimeria* sp., helmintów (Popiołek i wsp. 2011; Beltrán-Beck i wsp. 2012) oraz patogenów typu “vector-borne” (Hildebrand i wsp. 2018). Pomimo że szop jako obcy i inwazyjny gatunek, zarówno dziko żyjący, jak i potencjalnie synantropijny, występuje w Europie od 80 lat, wiedza na temat jego parazytofauny wciąż ma braki, zwłaszcza w odniesieniu do mikropasożytów o charakterze zoonotycznym. Zatem celem badań własnych była identyfikacja gatunków i genotypów *Cryptosporidium* spp. i mikrosporydiów występujących w europejskiej populacji szopa na nowo skolonizowanych obszarach Polski Zachodniej i Niemiec. Przeprowadzone przez mnie badania pozwoliły na wyznaczenia prewalencji badanych mikropasożytów na poziomie 34,7% dla *Cryptosporidium* spp. oraz 4,1 % dla *E. bieneusi*. W badanych próbkach nie wykryłam obecności *Encephalitozoon* spp. **Analiza otrzymanych przeze mnie sekwencji pozwoliła na zidentyfikowanie w badanych próbkach *Cryptosporidium* genotypu skunksa oraz *E. bieneusi* genotypu NCF2. W badaniach własnych po raz pierwszy zidentyfikowano u szopów *E. bieneusi* genotyp NCF2, który pierwotnie notowany u hodowlanych lisów i jenotów w Chinach (Xu i wsp. 2016; Zhang i wsp. 2016).** Przeprowadzona przeze mnie analiza filogenetyczna, w oparciu o sekwencje ITS, włącza ten genotyp do grupy 1 *E. bieneusi* zawierającej genotypy o potencjale zoonotycznym. Dotychczas nieliczne badania szopów, a dotyczące omawianej grupy pasożytów, prowadzone były tylko na terenie USA. Prewalencja *Cryptosporidium* spp. w amerykańskiej populacji szopa wahała się od 4% do 20% (Snyder i wsp. 1998; Feng i wsp. 2007), a analiza filogenetyczna wykazała obecność *Cryptosporidium* genotypu skunksa i *C. ubiquitum*. Inwazje u ludzi wywoływane genotypem skunksa, chociaż rzadkie, też są notowane (Elwin i wsp. 2012). Z kolei *E. bieneusi* został wykryty aż w 82% badanych próbek kału szopów z USA (Guo i wsp. 2014). Analizy molekularne pozwoliły na zidentyfikowanie szerokiej gamy genotypów o znaczeniu zoonotycznym, patogennych dla ludzi tj. Peru 11, Ebpc, WL15 i D oraz tych specyficznych dla szopów WL1-3, WL13, WL15-17, WL24, WL26 i WW6 (Sulaiman et al. 2003; Guo et al. 2014). Jak pokazały badania własne, szop jako gatunek introdukowany, stracił wiele z pierwotnie wykrytych na terenie USA gatunków/genotypów *Cryptosporidium* spp. i *E. bieneusi*. Z drugiej strony podczas swojej ekspansji nabył, nienotowany wcześniej na terenie USA,

E. bieneusi genotyp NCF2, który obecnie jest identyfikowany również u innych dzikich drapieżników – borsuka, lisa i jenota - na terenie Europy (Santin i wsp. 2018; Perec-Matysiak i wsp. w przygotowaniu). Zidentyfikowano również po raz pierwszy *Cryptosporidium* genotyp skunksa u badanych zwierząt, co mogłoby sugerować możliwość zawleczenia na badany teren tego pasożyta z introdukowanym szopem. Badania własne pokazały, że introdukowane i inwazyjne szopy w Europie można uznać za potencjalne źródło patogenego *Cryptosporidium* genotypu skunksa i potencjalnie patogenego *E. bieneusi* genotypu NCF2. **Efekt moich badań jest pierwsze doniesienie dotyczące występowania i identyfikacji mikrosporydiów i kryptosporydioz w europejskiej populacji szopa.** Coraz bardziej powszechna obecność szopa sugeruje możliwość transmisji i rozprzestrzeniania się pasożytów/patogenów „zawleczonych” z szopem na teren Europy, a jednocześnie nabywania przez niego pasożytów stwierdzanych u allopatrycznie występujących drapieżników takich jak jenot czy lis rudy. **Odkrycia te są istotne dla epidemiologii mikrosporydiozy i kryptosporydiozy, a także wskazują na znaczenie rozprzestrzeniającej się populacji zwierząt dziko żyjących, jako ważnego źródła zoonotycznych pasożytów istotnych z punktu widzenia zdrowia publicznego.**

P5. Perec-Matysiak A., Wesołowska M., Leśniańska K., Buńkowska-Gawlik K., Hildebrand J., Kicia M. 2017. **Survey for zoonotic microsporidian pathogens in wild living urban rooks (*Corvus frugilegus*).** Journal of Eukaryotic Microbiology, 64: 721-724.

Ptaki stanowią grupę kręgowców, w której także powszechnie identyfikowane są mikrosporydia. Badania nad *E. bieneusi* u ptaków dotyczą, jak dotychczas, występowania tego gatunku mikrosporidium u kurcząt hodowlanych, ozdobnych ptaków egzotycznych, ptactwa wodnego i wolno żyjących gołębi. Uważa się, że ptaki mogą stanowić źródło inwazji *E. bieneusi* dla ludzi, gdyż identyfikowane są u nich genotypy o charakterze zoonotycznym tj. D, Peru 6, Peru 6-like i Ebpa (np. Reetz i wsp. 2002; Lobo i wsp. 2006; Kasicková i wsp. 2009; Lallo i wsp. 2012; Zhao i wsp. 2016). Graczyk i wsp. (2007) wykazali, że spory *E. bieneusi* z kału gołębi, unoszące się w powietrzu, mogą drogą inhalacyjną powodować zarażenie u ludzi. Ponadto, spory *E. bieneusi* mogą utrzymywać się w powietrzu, wodzie i gołębih odchodach. *Encephalitozoon* spp. został opisanych u różnych gatunków ptaków, natomiast najczęściej identyfikowanym gatunkiem był *Enc. hellem* (Snowden i wsp. 2001; Słodkowicz-Kowalska i wsp. 2006). *Encephalitozoon cuniculi* i *Enc. intestinalis*, chociaż znacznie rzadziej, również wykryto w odchodach ptaków egzotycznych, wodnych i hodowlanych (Słodkowicz-Kowalska i wsp. 2006; Kasicková i wsp. 2009). Informacje na temat gatunków mikrosporydiów pasożytujących w miejskich populacjach ptaków są bardzo ograniczone i dotyczą gołębi badanych w Hiszpanii, Portugalii, Holandii, Polsce, Iranie, Brazylii,

Chinach (Haro i wsp. 2006; Lobo i wsp. 2006; Bart i wsp. 2008; Lallo i wsp. 2012; Pirestani i wsp. 2013; Słodkowicz-Kowalska i wsp. 2013; Zhao i wsp. 2016). Dlatego celem moich badań było wykazanie obecności mikrosporydiów w miejskiej populacji gawronów (*Corvus frugilegus*), które jak dotąd nie zostały objęte badaniami **(P5)**. Próbkę kału gawronów zostały zebrane z miejsc występowania tych ptaków, tj. z nekropolii znajdujących się na terenie Wrocławia. Ptaki te, licznie obserwowane, powszechnie występują w miastach w bardzo bliskim kontakcie z ludźmi, którzy mogą być narażeni na zarażenie tymi oportunistycznymi patogenami. W celu identyfikacji badanych mikrosporydiów przeprowadziłam analizy w oparciu o fragment ITS rRNA *E. bieneusi* i *Encephalitozoon* spp. Analiza uzyskanych sekwencji wskazała na obecność zoonotycznych genotypów *E. bieneusi* D i Peru 6 oraz *Enc. hellem* genotypu 1A, który wykazywał 99,6%-99,2% homologii z sekwencjami otrzymanymi od kolibra i człowieka. Badania innych autorów dotyczących genotypów *Enc. hellem* przeprowadzone w oparciu o analizę różnych markerów molekularnych, pokazują, że poszczególne izolaty w obrębie tych samych genotypów, lecz wywodzące się od ludzi z różnych regionów geograficznych, mogą się od siebie różnić (Xiao i wsp. 2001). Podobnie, zróżnicowanie w obrębie *E. hellem* genotypu 1A można zaobserwować u ptaków tj. kolibrów, gołębi oraz gawronów (Lee i wsp. 2011). **Badania własne po raz pierwszy identyfikują mikrosporydia w miejskiej populacji wolno żyjących gawronów i pokazują że kał tych ptaków może być istotnym źródłem zarażenia człowieka zoonotycznymi genotypami *E. bieneusi* i *Enc. hellem*.**

P6. Leśniańska K., Perec-Matysiak A. 2017. **Wildlife as an environmental reservoir of *Enterocytozoon bieneusi* (Microsporidia) – analyses of data based on molecular methods.** Annals of Parasitology, 63: 265–281.

Wyniki badań odnoszące się do występowania *Cryptosporidium* spp. i *Encephalitozoon* spp. u zwierząt dziko żyjących, ujęte są kilku pracach przeglądowych, natomiast jak dotychczas w literaturze brak było aktualnego opracowania takich danych w odniesieniu do *Enterocytozoon bieneusi*. Zatem w przedstawionej do osiągnięcia pracy przeglądowej **(P6)** postanowiłam dokonać podsumowania wiedzy dotyczącej występowania *E. bieneusi* u dziko żyjących żywicieli, uwzględniając wyniki badań różnych autorów poszerzone o wyniki badań własnych. Przygotowując się do napisania niniejszej pracy dokonałam wyczerpującego przeglądu literatury dotyczącej omawianego zagania. Niniejsza praca prezentuje dostępne wyniki badań molekularnych dotyczące zróżnicowania genotypów *E. bieneusi*, zarówno tych zoonotycznych, potencjalnie zoonotycznych, jak i żywicielsko specyficznych, wyizolowanych od dziko żyjących ssaków i ptaków, które stanowić mogą znaczący środowiskowy rezerwuuar tego patogenu. Dane

literaturowe, prócz dyskusji, zostały zaprezentowane w pracy w sposób syntetyczny w postaci tabel uwzględniających występowanie tego mikrosporydium w poszczególnych rzędach dziko żyjących ptaków i ssaków. Dodatkowo przedstawiłam także poznane drogi transmisji oraz metody wykrywania tego patogenu. Uwzględniłam również przypadki mikrosporydiozy wywoływanej przez *E. bieneusi* u ludzi, a także genotypy *E. bieneusi* najczęściej wykrywane u ludzi. Z dostępnej literatury wynika, że tylko precyzyjna identyfikacja molekularna patogenu może mieć wpływ na określenie zależności epidemiologicznych oraz oszacowanie ryzyka transmisji pasożyta poprzez stwierdzenie potencjalnych źródeł zarażenia. Istotna jest zatem kontynuacja badań nad tym gatunkiem mikrosporydium uwzględniająca poszerzenie zakresu żywicieli co ma wpływ na występowanie transmisji o charakterze zoonotycznym.

Podsumowanie

Uzyskane wyniki, uzupełniające dotychczasową wiedzę na temat roli dzikich zwierząt jako rezerwuarów środowiskowych mikropasożytów, które zostały przedstawione w pracach składających się na osiągnięcie habilitacyjne, można podsumować w następujący sposób:

1. Wykazano, że dziko żyjące gryzonie należące do podrodzin Murinae i Arvicolinae mogą pełnić rolę żywicieli rezerwuwarowych i przyczyniać się do rozprzestrzeniania spor mikrosporydiów *Enterocytozoon bieneusi* i *Encephalitozoon cuniculi* w środowisku. W przypadku *E. bieneusi* jest to pierwsze doniesienie z terenu Europy.
2. Przeprowadzone analizy molekularne pozwoliły na identyfikację u badanych gryzoni genotypów *E. bieneusi* zarówno o charakterze zoonotycznym, jak i dziesięciu nowych żywicielsko specyficznych nazwanych genotypami WR1-WR10. Analiza molekularna zidentyfikowanych genotypów podkreśla kompleksowość *E. bieneusi* i szczególną zdolność tego pasożyta do adaptacji i rozwoju u różnych żywicieli.
3. Najczęściej identyfikowany u badanych gryzoni *Encephalitozoon cuniculi* genotyp II, jest jednocześnie najczęściej wykrywanym u ludzi genotypem tego gatunku. Wskazuje to na potencjał gryzoni jako rezerwuarów patogennych mikrosporydiów.
4. Występowanie DNA *E. bieneusi* w próbkach śledziony badanych gryzoni może wskazywać na możliwość inwazji rozsianej.
5. Stwierdzono, że gryzonie z rodzaju *Apodemus* i *Myodes* mogą stanowić rezerwuwar dla *Cryptosporidium parvum* oraz *Cryptosporidium ubiquitum*.

6. Stwierdzono, że introdukowany i inwazyjny w Europie szop pracz może stanowić źródło zoonotycznego *Cryptosporidium* genotypu skunksa i potencjalnie zoonotycznego *E. bieneusi* genotypu NCF2. Jest to pierwsze doniesienie dotyczące obecności omawianych pasożytów u europejskiej populacji szopa.
7. Wykazano po raz pierwszy obecność zoonotycznych genotypów *E. bieneusi* i *Enc. hellem* w kale miejskiej populacji wolno żyjących gawronów.
8. W wyniku przeprowadzonych badań, dla identyfikowanych mikropasożytów, poszerzony został zakres żywicieli jako ważnego źródła zoonotycznych pasożytów istotnych z punktu widzenia zdrowia publicznego.

Kontynuacja badań oraz plany naukowe

Rozpoczęte i prezentowane wcześniej badania dotyczące *Cryptosporidium* spp. u dziko żyjących gryzoni były przeze mnie kontynuowane i przedstawione w pracy Čondlová i wsp. (2019), w której poddano bardziej szczegółowej identyfikacji molekularnej gatunki i genotypy kryptosporydiów występujących u gryzoni z rodzaju *Apodemus* w Europie. W badaniach, w których współuczestniczyłam, w wyniku przeprowadzonej analizy filogenetycznej opartej na polimorficznych *loci* tj. sekwencjach genów 18S rRNA, aktyny i COWP wykazano, że u gryzoni z rodzaju *Apodemus* w Europie, prócz wcześniej notowanych gatunków, dominują takie gatunki jak *Cryptosporidium ditrichi* i *Cryptosporidium apodemi* oraz dwa genotypy, nazwane jako *Cryptosporidium apodemus* genotyp I i II.

W dalszej pracy zamierzam kontynuować rozpoczęte badania nad dziko żyjącymi drapieżnikami (szop, jenot, lis rudy, borsuk i kuna) jako żywicielami omawianych grup pasożytów. Otrzymane wyniki badań własnych, wskazują, że lis rudy i jenot mogą być rezerwuarami patogennych i zoonotycznych dla człowieka *E. bieneusi* genotypów D i C (genotyp C po raz pierwszy wyizolowany został podczas moich badań z próbki pochodzenia zwierzęcego) oraz *Cryptosporidium canis* genotypu psa (Perec-Matysiak i wsp., w przygotowaniu).

We współpracy z czeskim zespołem, kierowanym przez prof. Martina Kváča z Laboratory of Veterinary and Medical Protistology, Institute of Parasitology w Czeskich Budziejowicach, planujemy przyrzeć się bliżej innym, jak dotąd nie badanym szczegółowo, grupom kręgowców tj. rydom, płazom i gadom jako żywicielom *Cryptosporidium* spp. Obecnie przygotowujemy wspólny wniosek grantowy do Narodowego Centrum Nauki. Ponadto, w ramach współpracy, zainicjowanej w czasie trwania programu COST pt. European Network for Neglected Vectors and Vector-Borne Infections, prowadzonej wraz z zespołem prof. Davida Modrego z University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences w Brnie, zamierzam kontynuować badania nad patogenami i pasożytami z grupy *vector-borne* u dziko żyjących drapieżników.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

Praca naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora

Moje zainteresowania naukowe, już od początku mojej kariery naukowej związane były z parazytologią. Dlatego też kolejne prace dyplomowe zrealizowałam w Zakładzie Parazytologii Uniwersytetu Wrocławskiego. W latach 1998 - 2004 tematyka naukowa Zakładu koncentrowała się głównie na **immunologicznych aspektach inwazji nicieni jelitowych**. Znane wtedy były podstawowe reakcje pojawiające się podczas indukcji i ekspresji odpowiedzi obronnej i większość z tych badań przeprowadzona została na modelowych układach inwazji pasożytniczych. Natomiast mało uwagi poświęconej było na poznanie reakcji obronnych zwierząt dziko żyjących, zarażonych pasożytami w sposób naturalny. Z tematem inwazji nicienia *Capillaria resecta* u dziko żyjących ptaków krukowatych związana była moja praca magisterska. Natomiast w pracy doktorskiej realizowałam temat związany z odpowiedzią immunologiczną myszy laboratoryjnych na naturalne zarażenie nicieniem jelitowym *Syphacia obvelata*. W badaniach tych analizowano odpowiedź humoralną powstałą u badanych żywicieli pod wpływem antygenów powierzchniowych i somatycznych tego pasożyta. Stwierdzono wówczas, że białka kutikularne nicienia, szczególnie najbardziej zewnętrzna frakcja tych białek, stanowiące powierzchnię oddziaływań pasożyt-żywiciel charakteryzowały się największą immunogennością u zarażonych myszy. Natomiast w odpowiedzi obwodowej zaznaczył się najwyższy poziom immunoglobulin klasy IgM, który ponadto dodatnio korelował z liczbą nicieni pasożytujących w jelicie myszy. Dodatkowo zaobserwowano, zarówno w trakcie prowadzenia badań jak i na podstawie danych literaturowych dotyczących badań nad schorzeniami takimi jak alergologia czy autoimmunologiczne procesy zapalne, że w wielu przypadkach wyniki badań prowadzonych na gryzoniach laboratoryjnych, mogą być obarczone zniekształceniem wynikającym ze współistniejących naturalnych inwazji specyficznych gatunków pasożytów, do których należy *S. obvelata*. Badania te zaowocowały kilkoma publikacjami oryginalnymi oraz przeglądowymi z zakresu immunoparazytologii (Okulewicz i Perec 2003; Perec 2005; Perec i Okulewicz 2006; Perec-Matysiak i wsp. 2006).

Praca naukowa po uzyskaniu stopnia doktora

Po obronie pracy doktorskiej, w 2005 roku zostałam zatrudniona, jako asystent, na etacie naukowo-dydaktycznym w Zakładzie Parazytologii. W trakcie mojej pracy w Zakładzie brałam i biorę udział w badaniach, których tematyka dotyczy wielu aspektów związanych z występowaniem i epidemiologią/epizoocjologią pasożytów i patogenów u wielu grup żywicielskich. Początkowo, moje zainteresowania naukowe skupione były na **tematyce związanej z helmintofauną różnych gatunków płazów, gadów i ssaków** (Okulewicz i wsp. 2005; Perec-

Matysiak i wsp. 2007; Buńkowska i wsp. 2011; Okulewicz i wsp. 2012; Okulewicz i wsp. 2014; Hildebrand i wsp. 2008; liczne doniesienia konferencyjne). Inny nurt badań związany był z zagadnieniem parazytologicznego monitoringu środowiska (Perec-Matysiak i wsp. 2008; Perec-Matysiak i wsp. 2009). W trakcie tych badań prowadziliśmy detekcję jaj geohelminatów w próbkach gleby pobranej z terenu Wrocławia.

W latach 2007-2010 dwukrotnie przebywałam na urlopach macierzyńskich i wychowawczych, co wpłynęło na spowolnienie tempa pracy naukowej.

Po powrocie z wyżej wymienionych urlopów uczestniczyłam w pracach Zakładu Parazytologii, którego tematyka badawcza skoncentrowana była, i wciąż jest skupiona, wokół zagadnienia jakim są **gryzonie jako żywiciela i rezerwuary środowiskowe pasożytów i patogenów**. W tym czasie włączyłam się w tematykę badawczą, a także uczestniczyłam we wprowadzaniu i rozwijaniu nowych technik badawczych opartych głównie o narzędzia biologii molekularnej, które obecnie są niezbędne we właściwej identyfikacji różnego typu patogenów i pasożytów. Wraz z pracownikami Instytutu Parazytologii Polskiej Akademii Nauk (Jeżewski i wsp. 2013), współuczestniczyłam w badaniach, które wykazały po raz pierwszy w Polsce występowanie larw inwazyjnych L3 *Aelurostrongylus abstrusus* u naturalnie zarażonych synantropijnych ślimaków nągich *Arion lusitanicus* (żywiciel pośredni) oraz u dziko żyjących gryzoni *Apodemus agrarius* (żywiciel parateniczny). W powyższej pracy potwierdziliśmy przydatność metod molekularnych w badaniu biologii, ekologii i epidemiologii *A. abstrusus*, czynnika etiologicznego aelurostrongylozy kotów. Uczestniczyłam także w badaniach, w których zastosowane metody mikroskopowe oraz molekularne umożliwiły wykrycie, po raz pierwszy w Polsce, *Calodium hepaticum* u szczura *Rattus norvegicus* (Buńkowska-Gawlik i wsp. 2017). Niciem ten występuje głównie u gryzoni, a także może powodować inwazje u innych gatunków ssaków, w tym człowieka. Zwieńczeniem kilkuletnich badań nad hemopasożytami gryzoni, było wykazanie przez zespół bawczy, w którym uczestniczyłam, DNA *Rickettsia helvetica* oraz *Rickettsia felis*-like w tkankach dzikich gryzoni, co sugeruje potencjalną rolę tych zwierząt w czasowym utrzymywaniu i rozprzestrzenianiu się tych bakterii w cyklach enzootycznych (Gajda i wsp. 2017). Praca ta została wykonana przy współpracy nawiązanej w czasie uczestnictwa w programie Europejskiego COST pt. *European Network for Neglected Vectors and Vector-Borne Infections (EURNEGVEC)* z prof. Heine Sprongiem z National Institute for Public Health and Environment w Holandii. W przygotowaniu są prace dotyczące gryzoni jako rezerwuarów innych patogenów, w tym z rodziny Anaplasmataceae oraz *Borrelia burgdorferi* s.l. i *Borrelia miyamotoi* (Gajda i wsp. w przygotowaniu). Gryzonie mogą również pełnić rolę rezerwuarów środowiskowych w stosunku do hantawirusów. We współpracy z zespołem prof. Richarda Yanagihara z University of Hawaii at Manoa, Honolulu na Hawajach, uczestniczyłam w badaniach, które umożliwiły przeprowadzenie charakterystyki molekularnej

hantawirusa Seewis wyizolowanego od ryjówek z terenu południowo-zachodniej Polski (Lee i wsp.; w recenzjach w *Virology Journal*).

Innym nurtem badawczym, w którego pracach obecnie uczestniczę, jest **występowanie i identyfikacja molekularna patogenów i pasożytów, transmitowanych głównie przez kleszcze, u zwierząt drapieżnych**. Sympatryczne występowanie rodzimych (lisy) i introdukowanych gatunków drapieżnych (szopy, jenoty) oraz udomowionych (psy) zwierząt ułatwia międzygatunkową transmisję patogenów. Dotychczas nie było danych dotyczących europejskiej populacji szopa jako rezerwuaru pasożytów/patogenów przenoszonych przez wektory, a niewiele badań dotyczyło jenota. Badania, w których uczestniczyłam (Hildebrand i wsp. 2018) pozwoliły na pierwsze molekularne stwierdzenie *A. phagocytophilum*, zoonotycznego ekotypu I, w introdukowanej europejskiej populacji szopa z terenu północno-zachodniej Polski. Z kolei u jenotów po raz pierwszy zidentyfikowany został *Candidatus Neoehrlichia* sp. (FU98). Poszerzony został zatem zakres żywicieli dla tego patogenu. Wyniki potwierdzają badania innych autorów, które wskazują na występowanie u dzikich drapieżników w Europie wyraźnie odrębnego szczepu *Candidatus Neoehrlichia* sp. Dzięki uczestnictwu w programie Europejskim COST (*EURNEGVEC*) nawiązałam współpracę z parazytologiem prof. Davidem Modrým z University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences w Brnie. Początkowo nasze zainteresowania naukowe skupiły się wokół tematyki związanej z *Babesia canis*, czynnikiem etiologicznym babeszjozy u psów, która uważana jest obecnie za chorobę typu *emerging* w Europie. Szerokie zastosowanie markera molekularnego o ograniczonej zmienności, jak 18S rDNA, nie oddaje w pełni zróżnicowania genetycznego *B. canis*. Jednak analiza sekwencji w oparciu o powyższy marker doprowadziła do zaobserwowania wewnątrzgatunkowej zmienności, a w konsekwencji do opisanie genotypów w obrębie *B. canis*. Wykorzystując materiał pochodzący z homogennej kohorty psów z potwierdzoną mikroskopowo babeszjozą, postanowiliśmy zbadać zróżnicowanie genetyczne wykrytych piroplazm, łącząc diagnostykę opartą na markerach jądrowych 18S rDNA oraz dwóch markerach mitochondrialnych tj. *cox1* i cytochrom b (Hrazdilová i wsp. 2019). Szerokie zastosowanie genów mitochondrialnych w identyfikacji i analizie filogenetycznej piroplazm, to podejście pionierskie w Europie. Analiza otrzymanych wyników pozwoliła na stwierdzenie paralogów 18S rDNA zastępując tym samym obecnie stosowaną teorię "genotypu". Dodatkowo wykazaliśmy, że cytochrom b jest alternatywnym markerem diagnostycznym dla *B. canis*, natomiast *cox1* jest obiecującym markerem molekularnym do analiz filogenetycznych oraz badań związanych z genetyką populacyjną. Obecnie kontynuujemy nasze badania nad rolą dziko żyjących drapieżników w epidemiologii piroplazm, gdyż szczególnie z terenu Europy Środkowej i Wschodniej, wciąż niewiele jest na ten temat informacji. Biorąc pod uwagę rosnącą liczbę ludzkich przypadków babeszjozy w Europie, na uwagę zasługuje udział drapieżnych w krążeniu ww. pierwotniaków,

szczególnie tych o potencjale zoonotycznym. Obecnie trwają końcowe prace podsumowujące wyniki badań nad *Babesia* spp. i *Theileria* spp. u dziko żyjących drapieżników (Hrazdilová i wsp., w przygotowaniu).

Poza badaniami nad mikropasożytami jelitowymi zwierząt dziko żyjących, które zostały omówione w osiągnięciu habilitacyjnym, uczestniczyłam również w pracach związanych z identyfikacją *Cryptosporidium* spp. u hodowlanych koni (Wagnerová i wsp. 2015). Analiza sekwencji genów SSU (małej podjednostki rybosomu) i gp60 pozwoliła na identyfikację *Cryptosporidium muris* RN66, *Cryptosporidium parvum* IlaA15G2R1, *Cryptosporidium tyzzeri* IXbA22R9 i *Cryptosporidium horse* genotype VIaA15G4. Jest to pierwsze doniesienie o subtypach *C. tyzzeri* i *C. muris* notowanych u koni.

Szczegółowe informacje dotyczące opublikowanych prac oraz podsumowania dorobku naukowego są przedstawione w Załączniku 3.

Literatura

1. Bajer A. 2008. Between-year variation and spatial dynamics of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. infections in naturally infected rodent populations. *Parasitol*, 135: 1629-1649.
2. Bajer A., Bednarska M., Pawełczyk A., Behnke J.M., Gilbert F.S., Siński E. 2002. Prevalence and abundance of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* spp. in wild rural rodents from Mazury Lake District region of Poland. *Parasitol* 125: 21-34.
3. Bajer A., Bednarska M., Siński E. 2001. Środowiskowe uwarunkowania zarażeń *Cryptosporidium parvum* w populacjach drobnych gryzoni. *Wiad Parazytol* 47: 747-753.
4. Bajer A., Caccio S., Bednarska M., Behnke J.M., Pieniazek J., Sinski E. 2003. Preliminary molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates of wildlife rodents from Poland. *J Parasitol* 89: 1053-1055.
5. Bart A., Wentink-Bonnema E.M., Heddema E.R., Buijs J., van Gool T. 2008. Frequent occurrence of human-associated microsporidia in fecal droppings of urban pigeons in Amsterdam, the Netherlands. *Appl Environ Microbiol* 74: 7056–7058.
6. Bartoszewicz M., Okarma H., Zalewski A., Szczesna J. 2008. Ecology of the raccoon (*Procyon lotor*) from western Poland. *Ann Zool Fennici* 45:291-298.
7. Beltrán-Beck B., Garcia F.J., Gortázar C. 2012. Raccoons in Europe: disease hazards due to the establishment of an invasive species. *Eur J Wildl Res* 58: 5-15.
8. Buńkowska K., Okulewicz A., **Perec-Matysiak A.**, Hildebrand J. 2011. Preliminary coproscopic examination of tortoises in the City Zoological Garden in Wrocław, Poland. *Wiad Parazytol* 57: 249-253.
9. Buńkowska-Gawlik K., **Perec-Matysiak A.**, Burzyńska K., Hildebrand J. 2017. The molecular identification of *Calodium hepaticum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*) in Poland. *Acta Parasitol* 62: 728-732.
10. Čondlová Š, Horčíčková M, Sak B, Květoňová D, Hlásková L, Konečný R, Stanko M, McEvoy J, Kváč M. 2018. *Cryptosporidium apodemi* sp. n. and *Cryptosporidium ditrichi* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in *Apodemus* spp. *Eur J Protistol* 63:1-12.
11. Čondlová Š, Horčíčková M., Havrdova N., Sak B., Hlaskova L., **Perec-Matysiak A.**, Kicia M., McEvoy J., Kváč M. 2019. Diversity of *Cryptosporidium* spp. in *Apodemus* spp. in Europe. *Europ J Protistol* 69: 1-13.
12. Danišová O., Valenčáková A., Stanko M., Luptáková L., Hasajová A. 2015. First report of *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* infection of wild mice in Slovakia. *Ann Agr Env Med* 22: 251–252.
13. Didier E.S. 2005. Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Trop* 94: 61–76.
14. Didier E.S., Stovall M.E., Green L.C., Brindley P.J., Sestak K., Didier P.J. 2004. Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Vet Parasitol* 126:145–166.
15. Didier E.S., Weiss L.M. 2011. Microsporidiosis: not just in AIDS patients. *Curr Opin Infect Dis* 24: 490–495.
16. Elwin K., Hadfield S., Robinson G., Chalmers R. 2012. The epidemiology of sporadic human infections with unusual cryptosporidia detected during routine typing in England and Wales, 2000-2008. *Epidemiol Infect* 140: 673–683.
17. Fayer R., Morgan U., Upton S.J. 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol* 30: 1305- 1322.

18. Fayer R., Santin M. 2014. Epidemiology of microsporidia in human infections. In: Weiss L. M. & Becnel J. J. (ed.), *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*. Wiley-Blackwell, Iowa, p. 135–164.
19. Feng Y., Alderisio K.A., Yang W., Blancero L.A., Kuhne W.G., Nadasdeski C.A., Reid M., Xiao L. 2007. *Cryptosporidium* genotypes in wildlife from a New York watershed. *Appl Environ Microbiol* 73: 6475–6483.
20. Feng Y., Ryan U., Xiao L. 2018. Genetic diversity and population structure of *Cryptosporidium*. *Trends Parasitol* 34: 997–1011.
21. Frońska-Popiel A., Okulewicz A., **Perec A.** 2001. Odpowiedź immunologiczna kawki (*Corvus monedula*) przeciwko antygenom nicienia *Capillaria reseca* – technika western blotting. *Wiad Parazytol* 47: 693–698.
22. Fuehrer H.P., Blöschl I., Siehs C., Hassl A. 2010. Detection of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, and *Encephalitozoon cuniculi* in the brains of common voles (*Microtus arvalis*) and water voles (*Arvicola terrestris*) by gene amplification techniques in western Austria (Vorarlberg). *Parasitol Res* 107: 469–473.
23. Gajda E., Hildebrand J., Sprong H., Buńkowska-Gawlik K., **Perec-Matysiak A.**, Coipan E.C. 2017. Spotted fever rickettsiae in wild-living rodents from south-western Poland. *Parasit and Vectors*, 10:413.
24. Graczyk T.K., Sunderland D., Rule A.M., da Silva A.J., Moura I.N., Tamang L., Girouard A.S., Schwab K.J., Breyse P.N. 2007. Urban feral pigeons (*Columba livia*) as a source for air- and waterborne contamination with *Enterocytozoon bieneusi* spores. *Appl Environ Microbiol* 73: 4357–4358.
25. Guo Y., Alderisio K.A., Yang W., Cama V., Feng Y., Xiao L. 2014. Host specificity and source of *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in a drinking source watershed. *Appl Environ Microbiol* 80:218–225.
26. Haro M., Henriques-Gil N., Fenoy S., Izquierdo F., Alonso F., Del Aguila C. 2006. Detection and genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* in pigeons. *J Eukaryot Microbiol* 53(Suppl 1): S58–S60.
27. Hildebrand J., Buńkowska-Gawlik K., Adamczyk M., Gajda E., Merta D., Popiołek M., **Perec-Matysiak A.** 2018. The occurrence of Anaplasmataceae in European populations of invasive carnivores. *Ticks and Tick-borne Dis* 9: 934–937.
28. Hildebrand J., Okulewicz A., Zaleśny G., **Perec-Matysiak A.** 2008. Site specific influence on the helminth community of small rodents in the Wrocław area (Poland). *Proceedings of 10th European Multicolloquium of Parasitology “From satellites to microsatellites”* 281: 233–236.
29. Hinney B., Sak B., Joachim A., Kváč M. 2016. More than a rabbit’s tale - *Encephalitozoon* spp. in wild mammals and birds. *Int J Parasitol: Parasites Wildl* 5: 76–87.
30. Horčíčková M., Čondlová Š., Holubová N., Sak B., Květoňová D., Hlášková L., Konečný R., Sedláček F., Clark M., Giddings C., McEvoy J., Kváč M. 2018. Diversity of *Cryptosporidium* in common voles and description of *Cryptosporidium alticolis* sp. n. and *Cryptosporidium microti* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). *Parasitol* 17: 1–14.
31. Hrazdilová K., Myśliwy I., Hildebrand J., Buńkowska-Gawlik K., Janaczek B., **Perec-Matysiak A.**, Modrý D. 2019. Paralogs vs. genotypes? Variability of *Babesia canis* assessed by 18S rDNA and two mitochondrial markers. *Vet Parasitol* 266: 103–110.
32. James T., Pelin A., Bonen L., Ahrendt S., Sain D., Corradi N., Stajich J.E. 2013. Shared signatures of parasitism and phylogenomics unite Cryptomycota and microsporidia. *Curr Biol* 23: 1548–1553.
33. Jeżewski W., Buńkowska-Gawlik K., Hildebrand J., **Perec-Matysiak A.**, Laskowski Z. 2013. Intermediate and paratenic hosts in the life cycle of *Aelurostrongylus abstrusus* in natural environment. *Vet Parasitol* 198: 401–405.
34. Karim M.R., Dong H., Li T., Yu F., Li D., Zhang L., Li J., Wang R., Li S., Li X., Rume F.I., Ning C. 2015. Predominance and new genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in captive nonhuman primates in zoos in China: high genetic diversity and zoonotic significance. *PLoS ONE* 10(2):e0117991.
35. Karim M.R., Wang R., Dong H., Zhang L., Li J., Zhang S., Rume F.I., Qi M., Jian F., Sun M., Yang G., Zou F., Ning C., Xiao L. 2014. Genetic polymorphism and zoonotic potential of *Enterocytozoon bieneusi* from nonhuman primates in China. *Appl Environ Microbiol* 80: 1893–1898.
36. Kasickova D., Sak B., Kvac M., Ditrich O. 2009. Sources of potentially infectious human microsporidia: molecular characterization of microsporidia isolates from exotic birds in the Czech Republic, prevalence study and importance of birds in epidemiology of the human microsporidial infections. *Vet Parasitol* 165: 125–130.
37. Lallo M.A., Calabria P., Milanelo L. 2012. *Encephalitozoon* and *Enterocytozoon* (Microsporidia) spores in stool from pigeons and exotic birds: microsporidia spores in birds. *Vet Parasitol* 190: 418–422.
38. Lobo M.L., Xiao L., Cama V., Magalhaes N., Antunes F., Matos O. 2006. Identification of potentially human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in various birds. *Appl Environ Microbiol* 72: 7380–7382.
39. Nichols G.L., Chalmers R.M., Hadfield S.J. 2014. Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. In Cacciò SM and Widmer G (eds), *Cryptosporidium: Parasite and Disease*. Wien: Springer, pp. 237–326.
40. Okulewicz A., Hildebrand J., Łysowski R., Buńkowska K., **Perec-Matysiak A.** 2014. Helminth communities of green and brown frogs from Poland (Lower Silesia Region). *J Herpetol* 48: 34–37.
41. Okulewicz A., Hildebrand J., Okulewicz J., **Perec A.** 2005. Lis rudy (*Vulpes vulpes*) jako rezerwuwar pasożytów i źródło zoonoz. *Wiad Parazytol* 51: 125–132.
42. Okulewicz A., **Perec A.** 2003. Parasite infections in laboratory mice colonies. *Pol J Vet Sci* 6: 27–31.
43. Okulewicz A., **Perec-Matysiak A.**, Buńkowska K., Hildebrand J. 2012. *Toxocara canis*, *Toxocara cati* and *Toxascaris leonina* in wild and domestic carnivores. *Helminthologia* 49: 3–10.
44. **Perec A.** 2005. Udział antygenów nicieni *Syphacia obvelata* (Oxyuridae) w powstawaniu odpowiedzi immunologicznej u myszy laboratoryjnej (szczep BALB/c). *Wiad Parazytol* 51: 169–171.

45. **Perec-Matysiak A.**, Hildebrand J., Zaleśny G., Buńkowska K., Okulewicz A. 2009. The evaluation of soil contamination with geohelminth eggs of different allotments from the area of Wrocław, Poland. *Materiały XVIII Wrocławskiej Konferencji Parazytologicznej* pt. "Różnorodność oddziaływania układów pasożyt-żywiciel w środowisku". Wrocław-Karpacz 21-23 maja 2009: XVII.
46. **Perec-Matysiak A.**, Hildebrand J., Zaleśny G., Okulewicz A., Fatuła A. 2008. Ocena stanu skażenia gleby jajami geohelmintów na terenie Wrocławia. *Wiad Parazytol* 54: 319-323.
47. **Perec-Matysiak A.**, Okulewicz A., Hildebrand J., Zaleśny G. 2006. Helminth parasites of laboratory mice and rats. *Wiad Parazytol* 52: 99-102.
48. **Perec-Matysiak A.**, Okulewicz A., Hildebrand J., Zaleśny G. 2007. Pasożytnicze helminty u ssaków w ogrodach zoologicznych. *Wiad Parazytol* 53: 15-20.
49. Pirestani M., Sadraei J., Forouzandeh M. 2013. Molecular characterization and genotyping of human related microsporidia in free-ranging and captive pigeons of Teheran, Iran. *Infect Gen Evol* 20: 495-499.
50. Popiołek M., Szczęśna-Staśkiewicz J., Bartoszewicz M., Okarma H., Smalec B., Zalewski A. 2011. Helminth parasites of an introduced invasive carnivore species, the raccoon (*Procyon lotor* L.), from the Warta Mouth National Park (Poland). *J Parasitol* 97: 357-360.
51. Reetz J., Rinder H., Thomschke A., Manke H., Schwebs M., Bruderek A. 2002. First detection of microsporidium *Enterocytozoon bieneusi* in non-mammalian hosts (chickens). *Int J Parasitol* 32: 785-787.
52. Ryan U., Xiao L. 2014. Taxonomy and molecular taxonomy, in: Cacciò, S.M., Widmer, G. (Eds.) *Cryptosporidium: parasite and disease*, 1 ed. Springer, pp. 3-42.
53. Sak B., Kváč M., Květoňová D., Albrecht T., Piálek J. 2011. The first report on natural *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon* spp. infections in wild East-European House Mice (*Mus musculus musculus*) and West-European House Mice (*M. m. domesticus*) in a hybrid zone across the Czech Republic-Germany border. *Vet Parasitol* 178: 246-250.
54. Santín M., Calero-Bernal R., Carmena D., Mateo M., Balseiro A., Barral M., Lima Barbero J.F., Habela M.Á. 2018. Molecular characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in wild carnivores in Spain. *J Eukaryot Microbiol* 65: 468-474.
55. Santín M., Fayer R. 2011. Microsporidiosis: *Enterocytozoon bieneusi* in domesticated and wild animals. *Res in Vet Sci* 90:363-371.
56. Słodkiewicz-Kowalska A., Graczyk T.K., Nowosad A., Majewska A.C. 2013. First detection of microsporidia in raised pigeons in Poland. *Ann Agric Environ Med* 20: 13-15.
57. Słodkiewicz-Kowalska A., Graczyk T.K., Tamang L., Jedrzejewski S., Nowosad A., Zduniak P., Solarczyk P., Girouard A.S., Majewska A.C. 2006. Microsporidian species known to infect humans are present in aquatic birds: implications for transmission via water? *Appl Environ Microbiol* 72: 4540-4544.
58. Snowden K., Daft B., Nordhausen R.W. 2001. Morphological and molecular characterization of *Encephalitozoon hellem* in hummingbirds. *Avian Pathol* 30: 251-255.
59. Snyder D.E. 1988. Indirect immunofluorescent detection of oocysts of *Cryptosporidium parvum* in the feces of naturally infected raccoons (*Procyon lotor*). *J Parasitol* 74: 1050-1052.
60. Sokolova O.I., Demianov A.V., Bowers L.C., Didier E.S., Yakovlev A.V., Skarlato S.O., Sokolova Y.Y. 2011. Emerging microsporidian infections in Russian HIV-infected patients. *J Clin Microbiol* 49: 2102-2108.
61. Solarczyk P., Majewska A.C. 2007. Molecular identification of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in humans and animals. *Wiad Parazytol* 53: 110.
62. Stenger B., Clark M., Kváč M., Khan E., Giddings C., Prediger J., McEvoy J. 2015. North American tree squirrels with overlapping ranges host different *Cryptosporidium* species and genotypes. *Infect Genet Evol* 36: 287-293.
63. Stenger B.L., Horčíčková M., Clark M.E., Kváč M., Čondlová S., Khan E., Widmer G., Xiao L., Giddings C.W., Pennil C., Stanko M., Sak B., McEvoy J.M. 2018. *Cryptosporidium* infecting wild cricetid rodents from the subfamilies Arvicolinae and Neotominae. *Parasitol* 14: 326-334.
64. Sulaiman I.M., Fayer R., Lal A.A., Trout J.M., Schaefer F.W., Xiao L. 2003. Molecular characterization of microsporidia indicates that wild mammals harbor host-adapted *Enterocytozoon* spp. as well as human pathogenic *Enterocytozoon bieneusi*. *Appl Environ Microbiol* 69: 4495-4501.
65. Lee S.H., Kim W.K., Gajda E., **Perec-Matysiak A.**, Hildebrand J., Yanagihara R., Song J.W. A small-scale epidemiologic survey and phylogenetic analysis of Seewis orthohantavirus (SWSV) in shrews, western Poland. *W recenzjach w Virology Journal*
66. Thellier M., Breton J. 2008. *Enterocytozoon bieneusi* in human and animals, focus on laboratory identification and molecular epidemiology. *Parasite* 15: 349-358.
67. Thompson R.C., Ash A. 2016. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *Infect Genet Evol* 40: 315-323.
68. Torchin M.E., Mitchell C.E. 2004. Parasites, pathogens and invasions by plants and animals. *Front Ecol Environ* 2:183-190.
69. Tsukada R., Tsuchiyama A., Sasaki M., Park C.H., Fujii Y., Takesue M., Hatai H., Kudo N., Ikadai H. 2013. *Encephalitozoon* infections in Rodentia and Soricomorpha in Japan. *Vet Parasitol* 198: 193-6.
70. Wagnerová P., Sak B., McEvoy J., Rost M., **Perec-Matysiak A.**, Ježková J., Kváč M. 2015. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. including novel identification of the *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium tyzzeri* in horses in the Czech Republic and Poland. *Parasitol Res* 114: 1619-1624.

71. Xiao L., Escalante L., Yang C., Sulaiman I., Escalante A.A., Montali R.J., Fayer R., Lal A.A. 1999. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl Environ Microb* 65: 1578–1583.
72. Xiao L., Fayer R., Ryan U., Upton S.J. 2004. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin Microb Revi* 17: 72–97
73. Xiao L., Feng Y. 2008. Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52: 309–323.
74. Xiao L., Li L., Moura H., Sulaiman I., Lal A.A., Gatti S., Scaglia M., Didier E.S., Visvesvara G.S. 2001. Genotyping *Encephalitozoon hellem* isolates by analysis of the polar tube protein gene. *J Clin Microbiol* 39: 2191–2196.
75. Xu C., Ma X., Zhang H., Zhang X.X., Zhao J.P., Ba H.X., Rui-Du X.X.M., Wang Q.K., Zhao Q. 2016. Prevalence, risk factors and molecular characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) in five provinces of Northern China. *Acta Trop* 161: 68–72.
76. Zhang X.X., Cong W., Lou Z., Ma J., Zheng W., Yao Q., Zhao Q., Zhu X.Q. 2016. Prevalence, risk factors and multilocus genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* in farmed foxes (*Vulpes lagopus*), Northern China. *Parasit Vectors* 9: 72.
77. Zhao W., Yu S., Yang Z., Zhang Y., Zhang L., Wang R., Zhang W., Yang F., Liu A. 2016. Genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* (Microsporidia) isolated from various birds in China. *Infect Genet Evol* 40: 151–154.

Agnieszka Perec-Matysik