

AUTOREFERAT

1) *Imię i Nazwisko*

**Małgorzata Bednarska**

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

- **2005 doktor nauk biologicznych w zakresie biologii**, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Tytuł rozprawy doktorskiej: "Wpływ czynników immunosupresyjnych na przebieg zarażenia *Cryptosporidium parvum* u myszy laboratoryjnych"; promotor: prof. dr hab. Edward Siński

- **1987 magister biologii, specjalność biologia ogólna**, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Tytuł pracy magisterskiej: " Odpowiedź anamnetyczna u myszy zarażonych *Trichinella spiralis* "; promotor: prof. dr hab. Edward Siński

3) *Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych*

- **2018-starszy wykładowca** w Zakładzie Parazytologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego
- **2005-2018 adiunkt** w Zakładzie Parazytologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego
- **2004-2005 asystent** w Zakładzie Parazytologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego
- **1987-2004 pracownik naukowo-techniczny** w Zakładzie Parazytologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego

4) *Wskazanie osiągnięcia\* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):*

a) tytuł osiągnięcia naukowego

**Jednokomórkowe gastro-enteropatogeny człowieka: badania środowiskowe i kliniczne**

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, ze szczegółowym omówieniem indywidualnego wkładu wnioskodawcy.

- 1) **Bednarska M**, Bajer A, Siński E, Girouard AS, Tamang L, Graczyk TK. 2007. Fluorescent in situ hybridization as a tool to retrospectively identify *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in samples from terrestrial mammalian wildlife. *Parasitology Research*, 100: 455-460.

IF 2007: **1.140**; punktacja MNiSW: **15**; liczba cytowań: **33**

Wkład habilitanta: 50%. wykonanie części doświadczeń polegających na analizie mikroskopowej materiału pochodzącego od dziko żyjących zwierząt opartej na metodach immunofluorescencyjnych IFA i FISH, których wyniki zamieszczone zostały w tabeli 1, analiza i interpretacja wyników badań, napisanie wstępnej wersji manuskryptu.

- 2) Bajer A, Toczyłowska B, **Bednarska M**, Siński E. 2012. Effectiveness of water treatment for the removal of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. *Epidemiology and Infection*, 140: 2014-2022.

IF 2012: **2.867**; punktacja MNiSW: **25**; liczba cytowań: **6**

Wkład habilitanta: 30%. Wykonanie części doświadczeń polegających na analizach parazytologicznych (metody immunofluorescencyjne i molekularne) prób wody pobranych z różnych źródeł: jeziora, rzeka, wodociąg, basen, których wyniki zamieszczone zostały w tabelach 1-2. Interpretacja wyników badań.

- 3) **Bednarska M**, Bajer A, Welc –Faleciak R, Czubkowski P, Teisseyre M, Graczyk TK, and Jankowska I. First case of *Enterocytozoon bieneusi* infection in Poland. 2013. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 20: 287–288.

IF 2012: **3,060\***; punktacja MNiSW: **30**; liczba cytowań: **7**

Wkład habilitanta: 70%. Autor korespondencyjny. Pomysłodawca koncepcji badań, wykonanie analiz parazytologicznych (mikroskopowych, immunofluorescencyjnych i molekularnych). Analiza i interpretacja wyników badań. Udział w przygotowaniu manuskryptu. Przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów. Pozyskanie finansowania badań (grant nr N N404 101036).

- 4) **Bednarska M**, Bajer A, Siński E, Wolska-Kuśnierz B, Samoliński B, Graczyk TK. 2014. The occurrence of intestinal microsporidia in immunodeficient patients in Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 21:244-248.

IF 2014: **1.126**; punktacja MNiSW: **10**; liczba cytowań: **6**

Wkład habilitanta: 60%. Autor korespondencyjny. Pomysłodawca koncepcji badań, wykonanie analiz parazytologicznych (mikroskopowych, immunofluorescencyjnych i molekularnych). Analiza i interpretacja wyników badań. Udział w przygotowaniu manuskryptu. Przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów. Pozyskanie finansowania badań (grant nr N N404 101036).

5) **Bednarska M**, Bajer A, Welc-Fałęciak R, Pawełas A. 2015. *Cyclospora cayetanensis* infection in transplant traveller: a case report of outbreak. *Parasit Vectors*, 8:411.

IF 2015: **3.234**, punktacja MNiSW: **35**; liczba cytowań: **5**

Wkład habilitanta: 80%. Autor korespondencyjny. Zaplanowanie i kierowanie badaniami oraz współwykonanie analiz mikroskopowych, immunofluorescencyjnych i molekularnych materiału biologicznego. Przygotowanie wersji pierwszej manuskryptu. Przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów. Pozyskanie finansowania badań (grant nr N N404 101036).

6) **Bednarska M**, Jankowska I, Pawełas A, Piwczyńska K, Bajer A, Wolska –Kuśnierz B, Wielopolska M, Welc-Faleciak R. 2018. Prevalence of *Cryptosporidium*, *Blastocystis*, and other opportunistic infections in patients with primary and acquired immunodeficiency. *Parasitology Research* 117:2869-2879.

IF 2017: **2.558**; punktacja MNiSW: **30**; liczba cytowań: **0**

5) Wkład habilitanta: 60%. Autor korespondencyjny. Pomysłodawca koncepcji badań. kierowanie badaniami oraz współwykonanie analiz mikroskopowych, immunofluorescencyjnych i molekularnych materiału biologicznego. Przygotowanie manuskryptu. Przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów. Pozyskanie finansowania badań (grant nr N N404 101036).

Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism [Impact Factor (IF)], w których ukazały się publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, zgodnie z rokiem opublikowania (w przypadku pracy z roku 2018/19 wykorzystano ostatnią dostępną w bazach wartość IF 2017) – **14,357**

Liczba punktów MNiSW za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego – **145**.

Liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego do dnia złożenia wniosku (wg bazy Web of Science) – **57**

\* *Brak danych dla roku 2013. Przyjęto wartość dla roku 2012, w którym praca zostały złożona do druku (27 02. 2012 r.)*

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

#### WSTĘP

Pasożyty jednokomórkowe (pierwotniaki i grzyby) występują dość powszechnie na całym świecie zarówno u ludzi jak i u zwierząt. Dla ludzi są uciążliwymi gastroenteropatogenami, nie rzadko powodując śmierć swoich żywicieli. Zarażone tymi pasożytami zwierzęta, które są zoonotycznym rezerwuarem tych patogenów, stanowią dość duże zagrożenie dla zdrowia publicznego. Zarażone zwierzęta przyczyniają się do skażenia cystami, oocystami lub sporami (formy dyspersyjne) tych pasożytów środowiska zewnętrznego. W środowisku poza żywicielem, na ogół formy dyspersyjne stają się inwazyjne. Człowiek najczęściej zaraża się tymi pasożytami na drodze pokarmowej, po przedostaniu się form inwazyjnych do organizmu z wodą lub żywnością (skażone warzywa, owoce, surowe lub niedogotowane mięso). Jest to pośrednia droga zarażenia będąca przyczyną u ludzi parazytozy nazywanej zoonozą (chorobą odzwierzęcą). Do zarażenia tymi pasożytami może dojść także podczas bezpośredniego kontaktu z chorym (zarażonym) człowiekiem lub zwierzęciem. Pasożyty te, najczęściej u ludzi z obniżoną odpornością, wywołują parazytozy z nasilającymi się objawami gastrycznymi (biegunki, bóle brzucha, nudności, wymioty). Kolejnym etapem rozwijającej się parazytozy mogą być zmiany gastroenteryczne m. in. stany zapalne jelit, dróg żółciowych, wątroby, lub pęcherza moczowego, płuc, nerek czy mózgu [1-3].

W literaturze medycznej ta grupa pasożytów określana jest mianem patogenów oportunistycznych, wiadomo bowiem, że u osób immunokompetentnych zarażenie tymi pasożytami przebiega bezobjawowo lub łagodnie, a objawy biegunkowe lub inne zaburzenia jelitowe trwają kilka, kilkanaście dni i samoistnie ustępują. Natomiast u osób z dysfunkcją układu immunologicznego dochodzi najczęściej do nietypowego i ciężkiego rozwoju oportunistycznej parazytozy, trudnej do wyleczenia. Pojawia się wodnista biegunka o dużej intensywności (ang. cholera like diarrhea) i/lub inne dolegliwości. Biegunka może mieć również charakter przewlekły prowadząc do odwodnienia, niedożywienia, spadku masy ciała i w konsekwencji do wyniszczenia organizmu. Na dotkliwy oportunizm tych inwazji szczególnie narażone są osoby z naturalnie obniżoną odpornością (dzieci, osoby starsze), osoby z wrodzonymi i trwale nabytymi niedoborami odporności (np. AIDS -acquired immune deficiency syndrome) oraz osoby przyjmujące leki immunosupresyjne np. po przeszczepach lub osłabione innymi czynnikami (m. in. przewlekły stres, wyniszczające choroby przewlekłe).

Pasożyty z rodzaju *Cryptosporidium* są 'klasycznymi' oportunistycznymi patogenami często wykrywanymi u osób z niedoborami odporności. U chorych na AIDS, w okresie przed wprowadzeniem terapii antyretrowirusowej (ARV), kryptosporydioza była często chorobą śmiertelną ze względu na brak skutecznego leczenia. Większość przypadków kryptosporydiozy u ludzi wywołują dwa gatunki: *C. parvum*, który oprócz człowieka pasożytuje ponad 100 gatunków ssaków, oraz *C. hominis* występujący głównie u ludzi. Pozostałe gatunki i genogatunki *Cryptosporidium*, spośród ponad 30 dotychczas opisanych, są pasożytami typowo zoonotycznymi i wstępują przede wszystkim u różnych gatunków zwierząt (ssaków, ptaków,

gadów). U osób immunologicznie niekompetentnych niektóre z tych pasożytów np. *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium felis*, *Cryptosporidium canis*, *Cryptosporidium muris*, *Cryptosporidium suis* wykazują właściwości patogeniczne i mogą być czynnikiem etiologicznym choroby pasożytniczej [4].

Inne mikropatogeny oportunistyczne takie jak *Cyclospora cayetanensis*, *Cystoisospora belli*, *Blastocystis hominis* czy wewnątrzkomórkowe grzyby - mikrosporidia z rodzajów *Encephalitozoon* i *Enterocytozoon*, także mogą być przyczyną uporczywych, wyniszczających biegunek. Badania naukowe potwierdzają, że mikrosporidia są również pasożytami różnych grupy zwierząt domowych, gospodarczych i wolno żyjących [5-6].

W trakcie badań epidemiologicznych dotyczących jelitowych inwazji pasożytniczych należy obowiązkowo uwzględnić uwiczonego pasożyta *Giardia intestinalis*. Jest to kosmopolityczny pierwotniak, będący najczęstszą przyczyną biegunek pasożytniczych u osób immunokompetentnych. Często też gatunek ten występuje w koinwazji z pasożytami należącymi do rodzaju *Cryptosporidium*, szczególnie w przebiegu inwazji u zwierząt [7].

Istotnym elementem kontroli oportunistycznych zarażeń pasożytniczych, z punktu widzenia zdrowia publicznego, jest poznanie źródeł i dróg transmisji form inwazyjnych. Stadia inwazyjne pasożytów są wydalane do środowiska zewnętrznego skażając glebę i wodę. *Cryptosporidium* i *Giardia* są najpowszechniej na świecie przekazywane i przenoszone poprzez skażoną wodę i glebę oraz przez zanieczyszczoną żywność. W Polsce zoonotycznym rezerwuarem tych pasożytów są najczęściej drobne gryzonie, bydło, zwierzęta ziemnowodne, kopytne oraz domowe skażające wodę i glebę przyczyniając się do skażenia środowiska zewnętrznego [8-10].

## CEL BADAŃ

Prace wchodzące w skład mojego osiągnięcia naukowego dotyczą kompleksowej oceny ryzyka występowania w środowisku, ważnej dla zdrowia publicznego, dużej grupy jednokomórkowych gastro-enteropatogenów zagrażających zdrowiu ludzi, szczególnie w populacjach osób z obniżoną odpornością.

W publikacjach stanowiących podstawę wskazanego osiągnięcia naukowego: (i) oceniłam rezerwuara zoonotyczny i ryzyko skażenia środowiska formami inwazyjnymi wybranych gatunków pasożytów, wykorzystując najnowsze metod molekularnej diagnostyki; (ii) zbadałam najnowszymi technikami immunofluorescencyjnymi żywotność/inwazyjność form dyspersyjnych określonych gatunków pasożytów wskazującą na realne zagrożenie epidemiologiczne dla ludzi; (iii) określiłam w badaniach klinicznych, na dużym reprezentatywnym materiale, przy zastosowaniu metod molekularnej diagnostyki, występowanie oraz chorobotwórczość wybranych inwazji pasożytniczych u osób z wrodzonymi i nabytymi niedoborami odporności.

(i) RYZYKO SKAŻENIA ŚRODOWISKA FORMAMI INWAZYJNYMI *CRYPTOSPORIDIUM* I *GIARDIA*.

(ii) OCENA ŻYWOTNOŚCI FORM DYSPERSYJNYCH WYKRYWANYCH PASOŻYTÓW.

---

#### **PUBLIKACJE:**

**Bednarska M**, Bajer A, Siński E, Girouard AS, Tamang L, Graczyk TK. 2007. Fluorescent in situ hybridization as a tool to retrospectively identify *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in samples from terrestrial mammalian wildlife. *Parasitology Research*, 100: 455-460.

Bajer A, Toczyłowska B, **Bednarska M**, Siński E. 2012. Effectiveness of water treatment for the removal of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. *Epidemiology and Infection*, 140: 2014-2022.

Stadia dyspersyjne pasożytów-oocysty *Cryptosporidium* i cysty *Giardia* wydalane są w ogromnych ilościach z kałem zarażonych zwierząt. Wykazują dużą oporność na zmienne warunki środowiskowe m. in. przesuszenie, przemrozenie, środki dezynfekcyjne, co sprzyja ich powszechnemu występowaniu w środowisku. *Cryptosporidium* i *Giardia* są przenoszone głównie poprzez wodę pitną i rekreacyjną, dlatego też badania epidemiologiczne w większości są skoncentrowane na gatunkach zwierząt ziemnowodnych. Potwierdziły one, że duże epidemie wodnopochoodne były związane z obecnością gatunków żywicielskich, ziemnowodnych i wodnych ssaków bytujących w dopływach stanowiących rejony ujęć wody pitnej. Znacznie mniejsza waga jest przykładana do badań nad gatunkami ssaków lądowych, które stanowią szeroki rezerwuuar zoonotyczny *Cryptosporidium* i *Giardia*, a oocysty i cysty skażające glebę stopniowo przedostają się do wód powierzchniowych [11].

Duże znaczenie dla badań epidemiologicznych kryptosporydiozy i giardiozy ma rozwój nowych technologii pozwalających na identyfikację oocyst i cyst w próbach klinicznych i środowiskowych. Badania immunofluorescencyjne stosowane często w badaniach środowiskowych wykrywają różne gatunki *Cryptosporidium* i *Giardia*, które nie zawsze są patogenne dla ludzi. Nie można także ocenić ich żywotności/inwazyjności w badaniu tego typu. Także techniki, takie jak łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR), wewnętrzny PCR (nested-PCR) i/lub analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP), chociaż są bardzo czułe, nie umożliwiają oceny żywotności, a więc potencjału inwazyjnego wykrytych pasożytów. Fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (FISH), po raz pierwszy zastosowana do tego typu badań jest techniką rozwiązującą oba problemy, czyli pozwala na identyfikację gatunku *C. parvum* i *G. intestinalis* i zarazem ocenę jego żywotności. W badaniach FISH wykorzystuje się: (i) barwienie immunofluorescencyjne (IFA), gdzie w reakcji bezpośredniej znakowane przeciwciała wiążą się z antygenami ścian oocyst *Cryptosporidium*/cyst *Giardia* barwiąc je na zielono (znacznik - izotjocyjanian fluoresceiny). Różne wielkości i kształty form dyspersyjnych (oocysty *Cryptosporidium* są kuliste o śr. 5 µm, cysty *Giardia* są owalne 7-10 µm) pozwalają na użycie tego samego barwnika do diagnostyki dwóch rodzajów pasożytów; (ii) sondy oligonukleotydowe CRY-1, GIAR-4 i GIAR-6 znakowane fluorochromem, które hybrydują ze

specyficznymi sekwencjami 18S rRNA obydwu gatunków pasożytów. Ponieważ sekwencje rRNA są obecne w dużych liczbach kopii jedynie w żywych organizmach dlatego też metoda FISH pozwala na odróżnienie inwazyjnych cyst/oocyst od stadiów nieinwazyjnych, niezdolnych do zarażenia i wywołania choroby. Należy podkreślić, że RNA i DNA gatunków *Cryptosporidium* i *Giardia* są dosyć stabilne, co ułatwia analizy retrospektywne [12].

W ramach przeprowadzonych badań środowiskowych wykorzystano techniki fluorescencyjne (IFA - fluorescent immunoassay, FISH) do identyfikacji oocyst/cyst *C. parvum* i *G. intestinalis* w próbach środowiskowych (kał, woda) oraz scharakteryzowano występowanie i intensywność inwazji tymi pasożytami u poszczególnych gatunków dzikich zwierząt, od których zostały pozyskane. W ramach prowadzonych badań retrospektywnie przebadaliśmy 45 próbek kału pochodzących od pięciu gatunków ssaków z terenów Polski: żubra, wilka i trzech gatunków drobnych gryzoni powszechnie występujących w Polsce, myszy leśnej (*Apodemus flavicollis*), nornicy rudej [*Myodes glareolus* (wcześniejsza nazwa *Clethrionomys glareolus*)] i nornika zwyczajnego (*Microtus arvalis*). Do badań wybraliśmy próby, które były przechowywane od 6 do 36 miesięcy w różnych temperaturach (-20°C, +4°C, +20°C) i mediach (PBS, dwuchromian potasu, bez medium). W przeprowadzonej analizie z wykorzystaniem połączonych testów IFA i FISH stwierdzono, że częstość występowania zarażeń *C. parvum* i *G. intestinalis* była najwyższa u gryzoni (średnio 68,5%) w porównaniu do częstości inwazji stwierdzonych w próbach pochodzących od żubrów (13%) i wilków (20%). U gryzoni najczęściej też występowały koinwazje obydwu gatunków pasożytów (52%) w porównaniu do liczby koinwazji u pozostałych gatunków badanych ssaków (13,2%). Przeprowadzone badania były pierwszymi z wykorzystaniem techniki FISH w retrospektywnych badaniach prób kałowych. Otrzymano wysokiej jakości obrazy w mikroskopie fluorescencyjnym z prób kałowych długo przechowywanych (do 36 mies.) w różnych temperaturach (-20°C, +4°C, +20°C). Wykazano także, że oocysty *Cryptosporidium* tylko w niewielkim odsetku były zniszczone i nie wybarwione przez sondy nukleotydowe. Około 95% oocyst było potencjalnie zdolnych do wywołania inwazji. Cysty *Giardia* okazały się być bardziej wrażliwe na zmienne warunki i czas przechowywania. Jedynie niewiele ponad 30% cyst tego gatunku było 'żywych', a więc inwazyjnych dla człowieka. Wykazaliśmy, że wolno żyjące gryzonie stanowią rezerwuuar zoonotyczny *C. parvum* i *G. intestinalis*. Potwierdziliśmy także, że oocysty *Cryptosporidium* są bardzo odporne na niekorzystne warunki środowiskowe i stanowią niebezpieczeństwo trwałego skażenia środowiska i wód powierzchniowych formami inwazyjnymi pasożyta. W naszych badaniach wykazaliśmy, że metoda FISH jest skutecznym narzędziem w retrospektywnych parazytologicznych badaniach środowiskowych.

Biorąc pod uwagę wyniki przedstawionych badań można założyć, że dochodzi do naturalnego skażenia gleb i wód na terenach zamieszkiwanych przez zarażone zwierzęta. W Polsce wody powierzchniowe obejmują 5572 km<sup>2</sup> (1,8%) obszaru kraju i często stanowią główne źródło wody pitnej w miastach. Skażenie źródeł wody oocystami/cystami *Cryptosporidium*/*Giardia* nie jest rutynowo monitorowane, także badania naukowe w tej dziedzinie są rzadkością w

naszym kraju. Nieliczne analizy potwierdzają występowanie tych pasożytów w wodach z okolic Poznania i Trójmiasta [13-14].

Mikroskopowa wielkość form dyspersyjnych, szczególnie oocyst *Cryptosporidium* (5µm) oraz ich oporność na zniszczenie sprawiają, że pasożyty mogą być nie w pełni eliminowane w procesach uzdatniania wody wodociągowej. W przeprowadzonych badaniach, przy współpracy z Instytutem Techniki Budowlanej w Warszawie, z wykorzystaniem badań immunofluorescencyjnych, określono stopień zanieczyszczenia oocystami i cystami *Cryptosporidium* i *Giardia* wybranych wód powierzchniowych oraz źródeł wody pitnej w Polsce. Przetestowano także skuteczność filtracji wody oczyszczonej przy użyciu specjalnie skonstruowanej kasety filtracyjnej z wysoce separacyjnymi specjalistycznymi filtrami (FiltMax; IDEXX, USA). Przebadano 94 próby wody z różnych regionów Polski, o objętości od 30 l/próba (wody powierzchniowe) do ponad 1000 l/próba (wody wodociągowe). W przeprowadzonych badaniach wykazano, że większość (84%) przebadanych wód powierzchniowych jest zanieczyszczona oocystami *Cryptosporidium*, a w ponad połowie występują cysty *Giardia* (60%). W połowie badanych rzek i jezior stwierdzono formy dyspersyjne obydwu rodzajów pasożytów. Analiza prób wody filtrowanej z użyciem kasety filtracyjnej wykazała, że zanieczyszczenie cystami i oocystami prób wody oczyszczonej jest kilkukrotnie zmniejszone. W surowych próbach wody powierzchniowej średnia intensywność wynosiła 9 (oo)cyst /10 l, podczas gdy po procesie filtracji, w oczyszczonych próbach wody liczba pasożytów wyniosła 0,06 (oo)cyst/10 l. Analiza mikroskopowa stopnia uszkodzenia form dyspersyjnych wykazała, że w procesie filtracji wody oocysty *Cryptosporidium* oprócz ograniczenia ich liczby ulegają także znacznemu zniszczeniu.

Podsumowując: (i) pasożyty z rodzajów *Cryptosporidium* i *Giardia* występują w wodach powierzchniowych i wodociągowych w Polsce; (ii) odpowiedni proces uzdatniania wody znacząco zmniejsza liczbę pasożytów; (iii) metody fluorescencyjne są skuteczne w monitoringu wody i wykrywaniu *Cryptosporidium* i *Giardia* w wodach różnego typu.

(iii) OKREŚLENIE CZĘSTOŚCI WYSTĘPOWANIA ORAZ CHOROBTWÓRCZOŚCI WYBRANYCH INWAZJI PASOŻYTNICZYCH U OSÓB Z WRODZONYMI I NABYTYMI NIEDOBORAMI ODPORNOŚCI.

---

Wyniki przeprowadzonych badań środowiskowych oraz wcześniejsze badania u ludzi stanowiły dla mnie przesłankę do analiz epidemiologicznych, ze szczególnym uwzględnieniem osób z niedoborami odporności. Najczęstszymi objawami inwazji pasożytniczych układu pokarmowego są dolegliwości jelitowe. Biegunka może być także pierwszym z objawów zaburzeń odporności. Jest ona często przewlekła i znacznie przedłużona w przebiegu chorób oportunistycznych, może prowadzić do odwodnienia i utraty masy, a w konsekwencji do zagrożenia życia. Przedstawione poniżej badania były częściowo finansowane z projektu MNiSzW nr. NN404101036 pt. „Zagrożenie infekcjami oportunistycznymi wywołanymi przez



Pasożyty u ludzi z niedoborami odporności”, którego byłem kierownikiem oraz prowadzone były przy współpracy z następującymi ośrodkami medycznymi: (1) Klinika Gastroenterologii, Hepatologii i Zaburzeń Odżywiania Centrum Zdrowia Dziecka, Warszawa (2) Poradnia Chorób i Transplantacji Wątroby CZD, Warszawa (3) Klinika Gastroenterologii i Hepatologii, Centrum Onkologii, Warszawa (4) Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa (5) Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny, Otwock.

#### **PUBLIKACJE:**

**Bednarska M**, Bajer A, Welc-Faleciak R, Czubkowski R, Teisseyre M, Graczyk TK, Irena Jankowska I. 2013. The first case of *Enterocytozoon bieneusi* infection in Poland, *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 20: 287–288.

**Bednarska M**, Bajer A, Siński E, Wolska-Kuśnierz B, Samoliński B, Graczyk TK. 2014. Occurrence of intestinal microsporidia in immunodeficient patients in Poland, *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 21: 244–248.

---

Wyniki przedstawione w kolejnych dwóch opracowaniach dotyczą występowania u ludzi zarażeń dwoma jelitowymi mikrosporydiami *Enterocytozoon bieneusi* (*E. bieneusi*) i *Encephalitozoon intestinalis* (*En. Intestinalis*). Pasożyty te są wyspecjalizowanymi grzybami wewnątrzkomórkowymi, które w obrębie jelit zarażają enterocyty i są odpowiedzialne za inwazje przewodu pokarmowego i dróg żółciowych u ludzi. Dodatkowo gatunek *En. intestinalis* zasiedla makrofagi i komórki śródbłonka, a po fazie inwazji jelitowej, często bezobjawowej, wywołuje rozsiane infekcje m. in. wątroby, nerek, pęcherza moczowego, ośrodkowego układu nerwowego lub narządu wzroku, w szczególności rogówki. Dwa pokrewne gatunki *En. cuniculi* i *En. hellem*, typowo zoonotyczne, też mogą być przyczyną rozsianych inwazji u ludzi immunologicznie niekompetentnych. Zainteresowanie tą grupą pasożytów rozpoczęło się od rozwoju pandemii AIDS na całym świecie. W 1985 roku gatunek *E. bieneusi*, a w 1992 gatunek *En. intestinalis* stwierdzono po raz pierwszy u ludzi, obydwa przypadki opisano u pacjentów zarażonych wirusem HIV. Od tego czasu mikrosporydia zostały uznane jak etiologiczny czynnik zarażeń oportunistycznych. Kliniczny przebieg mikrosporydiozy zależy od statusu immunologicznego pacjenta. Do grup ryzyka należą oprócz osób z HIV/AIDS, biorcy przeszczepów leczeni lekami immunosupresyjnymi, osoby podróżujące, dzieci i osoby starsze.

Stan epidemiologiczny mikrosporydiozy w Polsce jest bardzo słabo poznany. Nie istnieją dane na temat zarażeń jelitowych u pacjentów leczonych immunosupresyjnie przed i po transplantacji narządów. Przeprowadzone badania pozwoliły na przebadanie dzieci z wrodzonymi niedoborami odporności i dorosłych pacjentów leczonych immuosupresyjnie oraz opisanie pierwszego przypadku zarażenia *E. bieneusi* u biorcy przeszczepu w Polsce. Badania prowadzono przy współpracy z Poradnią Chorób i Transplantacji Wątroby Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie.

W trakcie czterech miesięcy badań, przebadano 60 dzieci z przeszczepem wątroby. Tylko u czterech z nich występowały objawy jelitowe. Wszystkie próby przebadano metodami mikroskopowymi (Chromotrop 2R) i molekularnymi (PCR) w kierunku inwazji *E. bieneusi* i *En. intestinalis*. Pozytywne wyniki PCR uzyskano dla jednej osoby (1/60=1,7%). Analiza filogenetyczna uzyskanej sekwencji DNA wykazała 100% identyczności z izolatem *E. bieneusi* pochodzącym od człowieka chorego na AIDS oraz bliskie pokrewieństwo z *Enterocytozoon* sp. pierwotnie wyizolowanym od psa (97,39%), co może świadczyć o zoonotycznym charakterze izolatu. Zarażona pacjentka była trzy miesiące po przeszczepie oraz z chorobami towarzyszącymi: mukowiscydozą, hiperglikemią i zakażeniem HCV. Inwazja *E. bieneusi* była bezobjawowa. Jako leczenie immunosupresyjne przyjmowała tacrolimus (0,13 mg/kg/dzień) i mykofenolan mofetilu (25,6 mg/kg/dzień). Zgodnie z naszą wiedzą jest to pierwszy w Polsce wykryty przypadek inwazji *E. bieneusi*, potwierdzony metodami molekularnymi. Na podstawie doniesień literaturowych do 2012 roku opisano niewiele ponad 20 inwazji *Encephalitozoon* spp. i *E. bieneusi* u osób po transplantacji, głównie organów i tylko 5 przypadków u pacjentów po przeszczepie wątroby [15-16].

Mikrosporydioza pomimo, że jest wykrywana u ludzi na całym świecie, to dane dotyczące występowania i rozmieszczenia geograficznego mikrosporydiów są niekompletne, zależne od stosowanych metod diagnostycznych i grup ryzyka. Najlepiej przebadaną grupą pacjentów są osoby HIV-pozytywne lub chore z AIDS, natomiast badania epidemiologiczne są nadal niewystarczające [17-18]. W Polsce wykrywanie mikrosporydiów nie jest rutynowo stosowane w praktyce klinicznej.

Opisane badania obejmują dwie grupy pacjentów: 31 dzieci z wrodzonymi niedoborami odporności oraz 49 dorosłych pacjentów z immunosupresją indukowaną medycznie przed/ po transplantacji szpiku lub organów. w analizach wykorzystano metody mikroskopowe i molekularne. Do barwienia rozmazów kałowych zastosowano metodę dedykowaną do wykrywania mikrosporydiów - barwienie Chromotrop-2R (barwnik trichromowy Wheatley'a). W preparatach barwionych spory mikrosporydiów mają wielkość 1-2 µm i wybarwiają się na kolor jasnoróżowy, a tło wybarwia się na kolor zielony. Spory mikrosporydiów mają wyraźne centralne przejaśnienie, które pozwala na odróżnienie ich od bakterii. Wszystkie pozytywne rozmazy zostały zweryfikowane przy współpracy z laboratorium Environmental Health Sciences, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, USA.

Diagnostyka molekularna opierała się na 3 parach starterów amplifikujących DNA małej podjednostki SSU rRNA pasożytów. W pierwszym etapie wykrywano DNA dwóch rodzajów *Encephalitozoon* i *Enterocytozoon*. W drugim etapie, w dwóch różnych reakcjach, wykrywano DNA określonych gatunków: *E. bieneusi* i *En. intestinalis*. U 12,5 % pacjentów potwierdzono występowanie mikrosporydiów. W trzech przypadkach potwierdzono inwazję *En. intestinalis* w gatunkowo- specyficznym badaniu PCR. W pozostałych przypadkach inwazje mikrosporydiami określono jedynie na podstawie obserwacji mikroskopowych lub 'szerokich starterach', które nie pozwalają na rozróżnienie gatunków. W większości przypadków mikrosporydioza była bezobjawowa, biegunka wystąpiła jedynie u dwóch pacjentów. Znacznie

częściej inwazje mikrosporydiami potwierdzono u osób dorosłych (17%) w stosunku do badanych dzieci (6%). Podobne wyniki uzyskano w badaniach pacjentów z przewlekłą biegunką (6 - 17% dla dzieci i osób starszych) [19-20]. Częstość występowania mikrosporidiów u pacjentów z HIV / AIDS na świecie waha się od 5% do 50% [21-23].

Główne osiągnięcia:

Badania przedstawione w powyższych publikacjach są pierwszymi epidemiologicznymi analizami przeprowadzonymi w Polsce, w zakresie występowania mikrosporydii u pacjentów z pierwotnymi i nabytymi niedoborami odporności. Występowanie grzybów z rodzajów *Enterocytozoon/Encephalitozoon* w naszych badaniach na poziomie 12% sugeruje, że te patogeny powinny być brane pod uwagę jako jeden z czynników etiologicznych chorób u pacjentów z wrodzonymi niedoborami odporności lub stosujących leki immunosupresyjne np. przed lub po przeszczepie. Dodatkowo bezobjawowe, ale dość częste inwazje mikrosporydii mogą stanowić czynnik ryzyka dla zdrowia w przypadkach zaawansowanej dysfunkcji systemu odpornościowego.

#### **PUBLIKACJA:**

**Bednarska M**, Bajer A, Welc-Falęciak R, Pawełas A. 2015. *Cyclospora cayetanensis* infection in transplant traveller: a case report of outbreak. *Parasites & Vectors*, 8:411.

---

W trakcie wyjazdów do krajów leżących w strefie podzwrotnikowej i zwrotnikowej podróźni narażeni są m. in. na inwazje typowe dla odwiedzanych regionów geograficznych. Często osoby wizytujące są bardziej podatne na zarażenia patogenami, które występują endemicznie, a rozwój inwazji pasożytniczych może mieć nasilony przebieg. Do takich pasożytów wywołujących tzw. 'biegunkę podróźnych' należy oprócz *Cryptosporidium* i *Giardia*, gatunek *Cyclospora cayetanensis*. Zarażenia występują głównie u podróźnych oraz mieszkańców na endemicznych obszarach Haiti, Gwatemali, Peru, Nepalu, a także w Stanach Zjednoczonych, Ameryce Środkowej i Południowej Azji poprzez spożycie świeżych warzyw, owoców, ziół lub wody zanieczyszczonej oocystami - formami inwazyjnymi pasożyta. Cyklosporoza jest rzadką chorobą, szczególnie w Europie gdzie zachorowania są na ogół stwierdzane u osób podróźujących do obszarów endemicznych i/lub pacjentami z HIV/AIDS. Ryzyko zarażenia wzrasta u osób zażywających leki immunosupresyjne [24-28].

W publikacji przedstawiono przypadek inwazji wodnopochoďnej *C. cayetanensis* u trzech męzczyzn z Polski, którzy powrócili z ostrą biegunką po podróży do Indonezji w listopadzie 2013 roku. Objawy zaburzeń jelitowych pojawiły się u wszystkich trzech osób w ciągu 5-14 dni, ale przebieg choroby był inny u kaźdego z podróźnych. Biegunka była najbardziej dokuczliwa i przewlekła u pacjenta po przeszczepie nerki przebyłym w 2010 r. Efektem trzymiesięcznej biegunki występującej u chorego z minimum dziesięcioma

wypróżnieniami dziennie był 15 kg ubytek masy ciała oraz dwukrotna hospitalizacja z powodu odwodnienia. Diagnoza i leczenie przeprowadzone w tym czasie było nieskuteczne. Pozostałe dwie osoby, immunokompetentne, zwalczyły objawy inwazji w ciągu 2-4 tygodni. W Zakładzie Parazytologii, w 3 miesiące po zarażeniu, przeprowadzono badania mikroskopowe i molekularne prób kałowych pochodzących od biegunkowego pacjenta będącego po transplantacji nerki. Rozmazy kałowe barwiono techniką Ziehl-Neelsena, która pozwala na wykrycie takich gatunków pierwotniaków jak *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Cystoisospora*. W naszym badaniu wykryto oocysty *Cyclospora* o wymiarach ok. 8-10  $\mu\text{m}$ , które barwią się na kolor różowy z widoczną wewnątrz niezróżnicowaną zawartością (oocysta przed sporulacją) lub dwoma sporocystami (oocysta po sporulacji). W drugim etapie badań przeprowadzono analizy molekularne z wykorzystaniem specyficznych starterów amplifikujących fragment genu 18S rRNA, którymi potwierdzono inwazję *C. cayetanensis* u badanego pacjenta. Określenie gatunku pasożyta pozwoliło na wdrożenie właściwego leczenia trimethoprimem i sulfametoksazolem przez okres 10 dni. Objawy biegunki zaczęły ustępować stopniowo od piątego dnia i ustąpiły w 8 dniu leczenia. Zahamowana została również utrata masy ciała pacjenta. Trzy miesiące po zakończeniu leczenia przeprowadzono w Zakładzie Parazytologii badania kontrolne, wykonane metodami mikroskopowymi i PCR, które nie potwierdziły obecności oocyst w otrzymanych próbkach.

Inwazje *C. cayetanensis* rzadko występują u biorców przeszczepów nerki i ryzyko zarażenia nie wydaje się być wysokie. Ważne jest jednak, aby w diagnostyce różnicowej podczas ciężkich, przewlekłych biegunek u osób z obniżoną odpornością uwzględniać ten gatunek obok częściej występujących inwazji *Giardia*, *Cryptosporidium* czy mikrosporydiów. Prawidłowa diagnoza ma zasadnicze znaczenie dla zastosowania odpowiedniego leczenia, gdyż w przypadku błędnego rozpoznania może dojść do silnego odwodnienia i zagrożenia życia.

W opisanym przypadku najbardziej prawdopodobną przyczyną inwazji wydaje się być wypicie niebutelkowanej wody podczas posiłku spożytego w lokalnej restauracji. Brak informacji o zdrowiu pozostałych klientów, którzy odwiedzili restaurację w tym dniu, nie pozwala określić rzeczywistego zasięgu omówionej powyżej inwazji wodnopochoďnej. W literaturze, oprócz obecnego przypadku, opisano dziewięć epidemii wodnopochoďnych wywołanych przez *C. cayetanensis*, w tym jeden rodzinny przypadek inwazji tym gatunkiem [29].

#### Główne osiągnięcia

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że osoby po przeszczepie nerek mogą być podatne na długotrwałą cyclosporozę. Wykrycie zarażenia *Cyclospora* może być problematyczne, ale dokładna identyfikacja gatunku pasożyta jest konieczna do wdrożenia skutecznego leczenia. Występowanie inwazji *C. cayetanensis* powinno być uwzględniane w

badaniach u osób powracających z regionów endemicznych, ze szczególnym uwzględnieniem pacjentów z niedoborami odporności.

#### **PUBLIKACJA:**

**Bednarska M**, Jankowska I, Pawełas A, Bajer A, Piwczyńska K, Wolska–Kuśnierz B, Wielopolska M, Welc-Fałęciak R. 2018. Prevalence of *Cryptosporidium*, *Blastocystis*, and other opportunistic infections in patients with primary and acquired immunodeficiency. *Parasitology Research*, 117:2869-2879.

---

Zarażenia pasożytnicze mogą stanowić istotny problem u osób z niedoborami odporności zarówno wrodzonymi jak i nabytymi. Kilkuletnie badania pozwoliły określić częstość występowania mikropatogenów jelitowych u hospitalizowanych pacjentów o różnym statusie immunologicznym.

W chwili obecnej ok. 30 zoonotycznych gatunków *Cryptosporidium* stanowią zagrożenie przede wszystkim dla osób z obniżoną odpornością. U osób immunokompetentnych dwa gatunki *C. hominis* typowo antroponotyczny i antropozoonotyczny *C. parvum* są przyczyną biegunek na całym świecie, ale coraz częściej *C. meleagridis* (pierwotnie zarażający ptaki) także jest wykrywany u tej grupy pacjentów. Pozostałe gatunki zoonotyczne są zazwyczaj przyczyną uporczywych biegunek, często zagrażających zdrowiu i życiu osób z obniżoną odpornością. Inne jednokomórkowe pasożyty (m. in. *Cyclospora*, *Cystoisospora*, *Microsporidia* czy *Blastocystis*) mogą być również czynnikami etiologicznymi dolegliwości żołądkowo-jelitowych lub w skrajnych przypadkach być przyczyną rozsianych inwazji zagrażających życiu [30].

W przeprowadzonej analizie, podsumowującej kilkuletnie badania pacjenci (121 mężczyzn i 164 kobiety w tym 221 dzieci i 64 osoby dorosłe), ze względu na różny status immunologiczny, zostali podzieleni na trzy grupy. Pierwsza grupa to 45 pacjentów immunokompetentnych. Drugą grupę stanowiło 155 pacjentów z łagodnymi niedoborami odporności (m. in. pospolity zmienny niedobór odporności [CVID], pierwotny niedobór odporności IgA, choroba przewlekła lub transplantacja z zastosowaniem małych dawek 1-2 leków immunosupresyjnych). Do trzeciej grupy zaliczono 85 pacjentów z ciężkim niedoborami odporności (m. in. wrodzone niedobory odporności [PID], wysokie dawki leków po transplantacjach lub inne przypadki wymagające zastosowania 2-3 medycznych środków immunosupresyjnych).

U 147 dzieci po transplantacji wątroby immunosupresję farmakologiczną utrzymywano lekami: takrolimus (TAC), syrolimus (SIR), cyklosporyna (CSR) osobno lub łącznie ze steroidami (ST), mykofenolanem mofetylu (MMF) lub azatiopryną (AZP). Pacjenci z tej grupy rzadko mieli biegunkę lub inne zaburzenia jelitowe (6/147). U większości dzieci z wrodzonymi niedoborami

odporności występowały przewlekłe lub nawrotowe biegunki (22/34). U 19 z 40 dzieci immunokompetentnych stwierdzano przewlekłe biegunki o nieustalonej etiologii.

U dorosłych pacjentów nabyte zaburzenia odporności wynikały z różnych ciężkich i/lub przewlekłych chorób i/lub stosowanych terapii [choroba Leśniowskiego-Crohna (CD), wrzodziejące zapalenie jelita grubego (UC), zakażenie *Clostridium difficile* (CDI), zakażenia wirusem cytomegalii (CMV), reumatoidalne zapalenie stawów (RAS), autoimmunologiczna enteropatia (AIE), zespół hipereozynofilowy (HES), powszechny zmienny niedobór odporności (CVID), rak dróg żółciowych (CCC), nieokreślona oporność immunologiczna (UIR), radioterapia (RTx)] i / lub leki stosowane [glukokortykoidy (GKS), AZP, 6 -merkaptopuryna (6-MP), MMF, Infliximabum (IFX)]. Większość pacjentów z tej grupy wykazywała przewlekłą biegunkę i/lub inne objawy jelitowe (54/64) często do kilku miesięcy.

W badaniach zastosowano metody mikroskopowe (barwienie Ziehl-Neelsena i Chromotro 2R) w tym immunofluorescencyjne (IFA *Cryptosporidium/Giardia*) oraz molekularne, które opisane zostały we wcześniejszych opracowaniach. W diagnostyce molekularnej w kierunku *Cryptosporidium* oprócz amplifikacji fragmentu genu 18S rRNA przy użyciu specyficznych starterów dodatkowo, do potwierdzenia zarażenia gatunkiem zoonotycznym *C. felis*, użyto zestawu starterów dla grupy Apicomplexa.

Analizując wyniki wieloletnich badań określono, że zarażenia mikropatogenami występowały 4 razy rzadziej u dzieci (3,2 %) niż u dorosłych 12,9% ( $p = 0,226$ ). Przebadani pacjenci byli zarażeni różnymi gatunkami *Cryptosporidium* oraz *G. intestinalis*, *C. cayetanensis* *B. hominis* i mikrosporidiami z rodzajów *Encephalitozoon* i *Enterocytosoon*. Występowały znaczne różnice w częstości występowania pasożytniczych Protista (*Cryptosporidium*, *Giardia*, *Cyclospora*) u mężczyzn (5%) i kobiet (0,6%) ( $p = 0,015$ ,  $df = 1$ ,  $\chi^2 = 5,885$ ). Większość zarażeń pasożytniczych odnotowano u pacjentów z ciężkimi niedoborami odporności (6,1%) dla których największe zagrożenie stanowiły pasożyty należące do taksonu Apicomplexa (obejmuje wyłącznie gatunki pasożytnicze): *Cryptosporidium* lub *Cyclospora*. U pacjentów z łagodną lub bez immunosupresji inwazje pasożytnicze stwierdzano znacznie rzadziej, odpowiednio u 0,6% i 2,2% przebadanych osób.

W opisywanych badaniach diagnostycznych została udokumentowana przypadki przewlekłej kryptosporydiozy (*C. meleagridis* i *Cryptosporidium* sp.) [31] oraz proces wyleczenia prześlędzony w latach 2007-2011. U pacjenta z Hiper IgM zarażonego *C. meleagridis* doszło do wyleczenia po czterech przeszczepach szpiku kostnego. Pacjent z przewlekłą kryptosporydiozą, u którego zdiagnozowano niedobór limfocytów CD40+ oraz stwardnienie dróg żółciowych wymagał przeszczepu szpiku kostnego, a także przeszczepu wątroby po wystąpieniu powikłań pod postacią GVHD (*graft-versus-host disease*). W obu przypadkach problem z kryptosporydiozą został rozwiązany i w ciągu kilku lat nie zaobserwowano nawrotu zarażenia *Cryptosporidium*.

Inny gatunek *C. felis* (pasożyt kotów) był przyczyną przewlekłej biegunki, która spowodowała utratę masy ciała oraz zagrożenie odrzucenia przeszczepu wątroby u 9 letniej

dziewczynki. Kryptosporydioza wiązała się z wieloma powikłaniami wątrobowo-jelitowymi. Zarażona dziewczynka mieszka w wiejskim otoczeniu, mając bezpośredni kontakt ze zwierzętami domowymi, psami i kotami oraz innymi zwierzętami hodowanymi. Najbardziej prawdopodobnym źródłem inwazji były koty z najbliższego otoczenia. U dzieci z krajów rozwijających się *C. felis* odpowiada za 3,3% wszystkich przypadków kryptosporydiozy [32]. W tym przypadku zakażenie *C. felis* nie zostało wykryte w teście immunofluorescencyjnym przeznaczonym do wykrywania szerokiego zakresu gatunków *Cryptosporidium* w próbkach kału pochodzącego od ludzi, prawdopodobnie ze względu na odrębność markerów tego gatunku (profil zoonotyczny). Inwazję potwierdzono w badaniach mikroskopowych, stosując barwienie Ziehl-Neelsena oraz techniką PCR. Wyniki te sugerują, że konieczne jest zastosowanie dwóch różnych metod wykrywania *Cryptosporidium* szczególnie w przypadku osób z niedoborami odporności. Rozpoznanie oparte wyłącznie na jednym badaniu mikroskopowym lub immunofluorescencyjnym, bądź jedynie wybranej metodzie molekularnej może prowadzić do uzyskania wyników fałszywie ujemnych.

Oprócz dobrze poznanych pasożytów, określono także częstość występowania *Blastocystis hominis*, jednokomórkowego organizmu o zmiennej pozycji systematycznej i nie do końca zbadanej patogenności. Ryzyko zarażenia wzrasta przy niedoborach odporności, a źródło zarażenia może być wodnopochoodne lub zoonotyczne.

W sprzyjających dla pasożyta warunkach *B. hominis* powoduje zaburzenia jelitowe, ale infekcja może być również samo-ograniczająca się lub bezobjawowa. Takie zróżnicowanie w zdolności pasożyta do wywołania objawów może mieć związek z jego zróżnicowaniem genetycznym w obrębie gatunku (subtype – ST). Najbardziej dominującym podtypem wykrywanym u ludzi jest podtyp ST-3 wykrywany w 42-92% przypadkach. Rzadziej u ludzi identyfikowane są podtypy ST-1 (7,7-25%), ST-6 (10 - 22,9%), ST-2 (1,3 do 32,1%) lub ST-4 (1,3 - 37,5%). Pozostałe genotypy (ST-5, ST7-9) wykrywane są w dużo mniejszych odsetkach [33, 34].

W przeprowadzonych badaniach zarażenia *B. hominis* wykryto tylko u dorosłych pacjentów (4,7%). Podtyp ST-2 wykryto u pacjenta z obniżoną odpornością, wrzodziejącym zapaleniem okrężnicy oraz koinfekcją Cytomegalowirusem (*human herpesvirus-5*)/*Clostridium difficile*. U osób immunokompetentnych, u których występował między innymi zmienny rytm wypróżnień, inwazja *Blastocystis* związana była z podtypem ST-3. Ze względu na retrospektywny charakter badań zastosowano wyłącznie metody molekularne. W diagnostyce tej pasożyty zalecane jest także badanie oparte na hodowli komórkowej. Badania tymi dwoma metodami znacząco podnoszą wykrywalności form rozwojowych *Blastocystis*. Chorobotwórczość *Blastocystis* nie jest w pełni potwierdzona. Wskazane są dalsze badania w celu określenia potencjalnego ryzyka zachorowania związanego z inwazyjnością oraz z potwierdzeniem patogenności poszczególnych podtypów tego pasożyta.

Biegunka po przeszczepieniu organów jest częstym i niepokojącym zjawiskiem u pacjentów. W naszych badaniach objawy ze strony przewodu pokarmowego były częściej zgłaszane u dzieci z wrodzonymi niedoborami odporności (65%) i dorosłych pacjentów (84%).

W grupie dzieci po przeszczepie wątroby tylko 2% z nich było zarażonych pasożytami i sporadycznie występowała biegunka (4%). Biegunka zazwyczaj jest częstym objawem ubocznego działania leków immunosupresyjnych (mykofenolanu mofetylu (MMF), cyklosporyny A (CSA), takrolimusa i syrolimusa) lub innych czynników zakaźnych np. wirusów (np. wirusa cytomegalii), bakterii lub grzybów (m.in. *Clostridium difficile*).

## **PODSUMOWANIE**

---

Najważniejsze moje osiągnięcia wynikające z badań, które prowadziłam:

1. Potwierdzenie, że pasożyty z rodzaju *Cryptosporidium* i *Giardia* występują często w próbach środowiskowych pochodzących od zwierząt dziko żyjących oraz w wodach powierzchniowych i wodociągowych w Polsce, co może świadczyć o zagrożeniu epidemiologicznym tymi gatunkami dla człowieka.
  
2. Wieloletnia analiza przeprowadzona wśród pacjentów z wrodzonymi i nabytymi niedoborami odporności w kierunku występowania zarażeń mikro-pasożytniczych. Wykazałam, że nie są to częste inwazje wśród pacjentów, ale należy mieć na uwadze, że każde zarażenie pasożytnicze u osób z obniżoną odpornością może stanowić istotne zagrożenie zdrowia lub życia.
  
3. Po raz pierwszy w Polsce, opisałam zarażenia mikrosporidiami *Enterocytozoon bueneusi*, *Encephalitozoon intestinalis* u osób z niedoborami odporności.
  
4. Wykazałam, że *Blastocystis hominis* może być czynnikiem etiologicznym zaburzeń jelitowych u ludzi.
  
5. Wykazałam, że w badaniach parazytologicznych istotne jest wykonanie właściwej diagnostyki różnicowej z wykorzystaniem kilku metod badawczych gdyż prawidłowa diagnoza, uwzględniająca gatunki zoonotyczne, ma zasadnicze znaczenie dla zastosowania odpowiedniego leczenia. U pacjentów z zaburzeniami odporności zaleca się wczesne i regularnie powtarzane badania przesiewowe w kierunku inwazji pasożytniczych.

Uzyskane wyniki umożliwiły poznanie i opracowanie różnych ścieżek diagnostycznych w celu wykrywania określonych grup mikropatogenów zagrażających zdrowiu człowieka. Zastosowanie opracowanych technik może znaleźć potencjalne zastosowanie w badaniach diagnostycznych.



W oparciu o rozpoznanie epidemiologiczne zarażeń pierwotniakami jelitowymi przedstawionych jako osiągnięcie habilitacyjne zostało założone, w 2015 roku, Laboratorium Amerlab Sp. z o.o. – pierwsza spółka typu „spin-off” łącząca dwa Uniwersytety: Uniwersytet Warszawski i Warszawski Uniwersytet Medyczny, którego jestem współzałożycielką. Jedną z dróg działania i rozwoju spółki jest działalność ośrodka diagnostyki medycznej.

#### LITERATURA

---

- [1] Pierce KK, Kirkpatrick BD. 2009. Update on human infections caused by intestinal protozoa. *Curr Opin Gastroenterol*, 25:12–17.
- [2] Caccio SM, Thompson RC, Mclachlin J, Smith HV. 2005. Unraveling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol*, 21:430–437.
- [3] Boughattas S, Behnke JM, Al-Ansari K, Sharma A, Abu-AlaininW, Al-Thani A, Abu-Madi MA. 2017. Molecular analysis of the enteric protozoa associated with acute diarrhea in hospitalized children. *Front Cell Infect Microbiol*, 7:343.
- [4] Caccio SM, Thompson RC, Mclachlin J, Smith HV. 2005. Unraveling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol*, 21:430–437.
- [5] Legua P, Seas C. 2013. *Cystoisospora* and *Cyclospora*. *Curr Opin Infect Dis*, 26:479–483
- [6] Anane S, Attouchi H. 2010. Microsporidiosis: epidemiology, clinical data and therapy. *Gastroenterol Clin Biol*, 34:450–464.
- [7] Bednarska M, Bajer A, Siński E. 1998. Calves as a potential reservoir of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* sp. *Ann Agric Environ Med*, 5:135-138.
- [8] Bednarska M, Bajer A, Kuliś K, Siński E. 2003. Biological characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates of wildlife rodents in Poland. *Ann Agric Environ Med*, 10:163-169.
- [9] Kloch A, Bednarska M, Bajer A. 2005. Intestinal macro– and microparasites of wolves (*Canis lupus* L.) from north–eastern Poland recovered by coprological study. *Ann Agric Environ Med*, 12:237-245.
- [10] Appelbee AJ, Thompson RCA, Olson ME. 2005. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife – current status and future needs. *Trends Parasitol*, 21:370-376.
- [11] Graczyk TK, Fayer R, Cranfield MR. 1997. Zoonotic potential of *Cryptosporidium parvum*: implications for waterborne cryptosporidiosis. *Parasitol Today*, 13:348–351.
- [12] Graczyk TK, Cranfield MR, Fayer R. 1996. Evaluation of commercial enzyme immunoassay (EIA) and immunofluorescent antibody (IFA) tests kits for detection of *Cryptosporidium* oocysts other than *Cryptosporidium parvum*. *Am J Trop Med Hyg*, 54:274–279.

- [13] Majewska AC, Kosiński Z, Werner A, Sulima P, Nowosad P. 2001. Intestinal protozoan parasites: new waterborne risk factor for public health. Ed. University of Warsaw, Warsaw, 2nd edn. pp 26.
- [14] Szostakowska B, Kruminis-Łozowska W, Graczyk TK, Myjak P. 2005. Prevalence of *Cryptosporidium* oocysts in surface waters of Tri-city and its vicinity. Abstracts of International Conference 'Biological and Chemical Factors of Environmental Contamination', Warsaw, p. 21.
- [15] Lanternier F, Boutboul D, Menotti J, Chandesris MO, Sarfati C, Mamzer Bruneel MF, et al. 2009. Microsporidiosis in solid organ transplant recipients: two *Enterocytozoon bieneusi* cases and review. *Transpl Infect Dis*, 11: 83–8.
- [16] Galván AL, Sánchez AM, Valentín MA, Henriques-Gil N, Izquierdo F, Fenoy S, et al. 2011. First cases of microsporidiosis in transplant recipients in Spain and review of the literature. *Clin Microbiol*. 2011 49: 1301–6.
- [17] Sak B, Brady D, Pelikanova M, et al. 2011. Unapparent microsporidial infection among immunocompetent humans in the Czech Republic. *J Clin Microbiol*, 49: 1064–1070.
- [18] Lobo ML, Xiao L, Antunes F, et al. 2012. Microsporidia as emerging pathogens and the implication for public health: a 10-year study on HIV-positive and -negative patients. *Int J Parasitol*, 42: 197–205.
- [19] Valperga SM, de Jogna Prat SA, de Valperga GJ et al. 1999. Microsporidian spores in the stool specimens of toddlers, with or without diarrhea, from Tucuman. Argentina. *Rev Argent Microbiol*, 31: 157–164.
- [20] Muller A, Bialek R, Kamper A, et al. 2001. Detection of microsporidia in travelers with diarrhea. *Journal Clin Microbiol*, 39: 1630–1632.
- [21] Dworkin MS, Buskin SE, Davidson AJ, et al. 2007. Prevalence of intestinal microsporidiosis in human immunodeficiency virus infected patients with diarrhea in major United States cities. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 9: 339–342.
- [22] Espern A, Morio F, Miegerville M, et al. 2007. Molecular study of microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* among human immunodeficiency virus-infected patients from two geographical areas: Niamey, Niger, and Hanoi, Vietnam. *J Clin Microbiol*, 45: 2999–3002.
- [23] Sokolova OI, Demyanov AV, Bowers LC, et al. 2011. Emerging microsporidian infections in Russian HIV-infected patients. *J Clin Microbiol*, 49: 2102–2108.
- [24] Verweij JJ, Laeijendecker D, Brienen EA, van Leishhout L, Polderman AM. 2003. Detection of *Cyclospora cayetanensis* in travellers returning from the tropics and subtropics using microscopy and real-time PCR. *Int J Med Microbiol*, 93:199–202.
- [25] Bouree PA, Lancon F, BisaroBonnot G. 2007. Six human cyclosporiasis: with general review. *J Egypt Soc Parasitol*. 37:349–60.

- [26] Ortega YR, Sanchez R. 2010. Update on *Cyclospora cayetanensis*, a Food-Borne and Waterborne Parasite. *Clin Microbiol Rev.* 23:218–34.
- [27] Kilbas ZG, Yenicesu M, Araz E, Tanyüksel M. 2009. *Cyclospora cayetanensis* Infection in a Patient with Renal Transplant. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 66:25–7.
- [28] Visvesvara GS, Arrowood MJ, Qvarnstrom Y, Sriram R, Bandea R, Wilkins PP, et al. 2013. Concurrent parasitic infections in a renal transplant patient. *Emerg Infect Dis*, 19:2044–5.
- [29] Madico G, McDonald J, Gilman RH, Cabrera L, Sterling CR. 1997. Epidemiology and treatment of *Cyclospora cayetanensis* infection in Peruvian children. *Clin Infect Dis*, 24:977–81.
- [30] Azami M, Sharifi M, Hejazi SH, Tazhibi M. 2010. Intestinal parasitic infections in renal transplant recipients. *Braz J Infect Dis*, 14:15–18.
- [31] Wolska-Kusnierz B, Bajer A, Caccio S, Heropolitanska-Pliszka E, Bernatowska E, van Dongen J, Bednarska M, Paziewska A, Siński E. 2007. *Cryptosporidium* infection in patients with primary immunodeficiency syndromes. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 45:458–164.
- [32] Lucio-Forster A, Griffiths JK, Cama VA, Xiao L, Bowma DD. 2010. Minimal zoonotic risk of cryptosporidiosis from pet dogs and cats. *Trends Parasitol*, 26:174–179.
- [33] Tan K. 2004. Review *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies. *Vet Parasitol*, 126:121–144.
- [34] Alfellani MA, Jacob AS, Perea NO, Krecek RC, Taner-Mulla D, Verweij JJ, Levecke B, Tannich E, Clark CG, Stensvold CR. 2013. Diversity and distribution of *Blastocystis* sp. subtypes in non-human primates. *Parasitology*, 140:966–971.

#### 5) Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

#### OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO – BADAWCZE PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

Przed uzyskaniem stopnia doktora byłam współautorem 15 prac naukowych o charakterze:

- (1) badań środowiskowych i epidemiologicznych, które dotyczyły zagadnień związanych z występowaniem mikroorganizmów z rodzajów *Cryptosporidium* i *Giardia* w populacjach różnych grup zwierząt, oraz charakterystyką mikroskopową i molekularną badanych mikroorganizmów
- (2) badań epidemiologicznych związanych z wykrywaniem zarażeń mikropatogenami ze szczególnym uwzględnieniem *Cryptosporidium* u dzieci z niedoborami odporności

(3) badań eksperymentalnych skupiających się nad utworzeniem modelu doświadczalnego, z wykorzystaniem gryzoni, do wyjaśnienia mechanizmów obronnych w inwazjach *Cryptosporidium*.

#### (1) BADANIA ŚRODOWISKOWE

- Siński E, **Czarnogrecka M.** 1989. *Cryptosporidium* sp. infection in snakes. *Acta Parasitologica*, 34: 307-310.
- Siński E, Hlebowicz E, **Bednarska M.** 1993. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* infection in wild small mammals in District of Mazury Lake (Poland) *Acta Parasitologica*, 38: 59-61.
- Siński E, **Bednarska M**, Bajer A. 1998. The role of wild rodents in ecology of cryptosporidiosis in Poland. *Folia Parasitologica*, 45: 173-174.
- **Bednarska M**, Bajer A, Siński E. 1998. Calves as a potential reservoir of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* sp. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 5: 135-138.
- Siński E. 2001. Środowiskowe uwarunkowania zarażeń *Cryptosporidium parvum* w populacjach drobnych gryzoni. *Wiadomości Parazytologiczne*, 47: 747-753.
- Bajer A, **Bednarska M**, Pawełczyk A, Behnke JM, Gilbert FS, Siński E. 2002. Prevalence and abundance of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* spp. in wild rural rodents from the Mazury Lake District region of Poland. *Parasitology*, 125: 21-34.
- Bajer A, Caccio S, **Bednarska M**, Behnke JM, Pieniążek NJ, and Siński E. 2003. Preliminary molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates of wildlife rodents from Poland. *Journal of Parasitology*, 89: 140-142.
- Bajer A, Behnke JM, **Bednarska M**, Kuliś K, Siński E. 2004. Współwystępowanie *Cryptosporidium parvum*, *Giardia* spp. i helmintów w populacjach drobnych gryzoni. *Wiadomości Parazytologiczne*, 50: 307-315.
- Bajer A, **Bednarska M**, Siński E. 2005. Molekularne badania inwazji *Cryptosporidium* spp. *Medycyna Weterynaryjna*, 61: 543-547. MNiSW=7
- Kloch A, **Bednarska M**, and Bajer A. 2005. Intestinal macro- and microparasites of wolves (*Canis lupus* L.) from north-eastern Poland recovered by coprological study. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 12: 237-245. F=1.051

Pierwsza z publikacji dotyczyła określenia czynnika etiologicznego wywołującego biegunki u 4 węży (*Elaphe obsoleta*, *E. quatuorlineata*, *E. schrenkei*, *E. guttata*, *Boaedon fuliginosus*) pochodzących z prywatnej hodowli. Określiśmy, że czynnikiem etiologicznym było *Cryptosporidium*, mało poznany w tym czasie pasożyt w Polsce.

W trakcie wieloletnich badań środowiskowych brałam udział w badaniu rozprzestrzenienia pierwotniaków *Cryptosporidium* i *Giardia* u wolnożyjących gryzoni, bydra i psowatych. Analizy opierały się na badaniach mikroskopowych, immunofluorescencyjnych i molekularnych w celu określenia pokrewieństwa filogenetycznego izolatów od różnych żywicieli. Badania molekularne pozwoliły na ocenę zagrożenia zdrowia publicznego poprzez ocenę rozprzestrzenienia gatunków/genotypów zoonotycznych pasożytów. Bardzo ważnymi

badaniami były analizy materiału pochodzącego z hodowli bydła, ze względu na możliwość skażenia środowiska patogennymi dla ludzi gatunkami *Cryptosporidium* i *Giardia*. Badania z wykorzystaniem techniki Ziehl-Neelsena i testu immunofluorescencyjnego pozwoliły nam stwierdzić obecność *Cryptosporidium* i *Giardia* w 67% badanych gospodarstw. Częstość występowania zarażeń jednym lub drugim gatunkiem wahała się od 20 do 88%, ponadto w niektórych gospodarstwach intensywność wydalania oocyst *Cryptosporidium* przez bydło była bardzo wysoka. Udany pasaż izolatów *Cryptosporidium* pochodzących od bydła na myszy C57BL/6 potwierdził, że naturalnie zarażone bydło może być źródłem pasożyta dla gryzoni.

Wykazaliśmy, że zarażenie *Cryptosporidium* w populacji drobnych gryzoni na Pojezierzu Mazurskim ma charakter chroniczny i współwystępuje w koinwazji z nicieniami i tasiemcami pasożytującymi u tej grupy zwierząt. U nornicy rudej (*Clethrionomys glareolus*) stwierdziliśmy, że występowanie nicieni z rodzajów *Heligmosomoides* i *Heligmosomum* wpływa na utrzymywanie się, u dorosłych zwierząt, zarażenia *C. parvum* nawet przez kilka miesięcy i nie dochodziło u nich do samowyleczenia Bednarska i wsp. 2003.

W naturalnie zarażonych populacjach gryzoni wykazaliśmy zarażenia gatunkami/ genotypami inwazyjnymi dla ludzi (*C. parvum* 'mouse' genotype, *G. intestinalis* Assemblage A), a także zoonotyczny genotyp *C. parvum* u wilków. U psów wykryliśmy jedynie specyficzny dla tych żywicieli genotyp *G. intestinalis* Assemblage C.

Ze względu na wysoki odsetek zarażeń pierwotniakami u różnych grup żywicieli, a także występowanie gatunków/ szczepów zoonotycznych oceniliśmy ryzyko występowania kryptosporidiozy/ giardiozy u ludzi w Polsce na wysokie.

## (2) BADANIA EPIDEMIOLOGICZNE

- Siński E, Bukowska J, **Czarnogrecka M**, Oralewska B, Świątkowska E, Socha J. 1991. Zarażenie *Cryptosporidium* sp. i *Blastocystis hominis* u dzieci z objawami gastroenterocolitis. *Wiadomości Lekarskie*, 44: 157-160.

Jedną z pierwszych publikacji w której byłam współautorem była wynikiem współpracy z Centrum Zdrowia Dziecka i dotyczyła charakterystyki mikropatogenów, które były przyczyną przewlekłych dolegliwości jelitowych u dzieci. Przebadaliśmy grupę 560 pacjentów w wieku od 0,2 do 17 lat z objawami biegunkowymi o niewyjaśnionej etiologii. Przeprowadzone analizy pozwoliły określić, że czynnikiem etiologicznym nawracających biegunek u pacjentów z obniżoną odpornością może być wewnątrzkomórkowy pasożyt z rodzaju *Cryptosporidium*. Były to jedne z pierwszych badań potwierdzających zarażenia tym pasożytem u ludzi w Polsce. Z ówczesnej wiedzy wynikało, że inwazje u żywicieli o sprawnym systemie odpornościowym, po krótkotrwałej fazie ostrej inwazji (1-2 tygodnie) ulegały szybkiemu wyleczeniu natomiast w przypadku niedoborów odporności rozwijała się chroniczna inwazja, często groźna w klinicznych skutkach.

### (3) BADANIA EKSPERYMENTALNE

- Siński E, **Bednarska M**, Adamczewska A. 1992. Biological characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates in suckling and immunosuppressed mice. *Acta Parasitologica*, 37: 139-143.
- **Bednarska M**, Bajer A, Kuliś K, Siński E. 2003. Biological characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates of wildlife rodents in Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 10: 163-169.
- Donskow K, Bajer A, **Bednarska M**, Siński E. 2005. Experimental transmission of *Cryptosporidium parvum* isolates from wild rodents and calves to laboratory bred common vole (*Microtus arvalis*). *Acta Parasitologica*, 50: 19-24.

W wielu doświadczeniach wykazano, że dorosłe myszy laboratoryjne nie ulegają zarażeniu *C. parvum* w ogóle, lub czas inwazji pasożyta jest krótkotrwały. Jedynie u bardzo młodych osobników, do trzeciego tygodnia życia, które nie posiadają w pełni rozwiniętego systemu immunologicznego oraz u myszy z upośledzonym systemem odpornościowym można obserwować chroniczną, długotrwałą inwazję. Przeprowadzone badania miały na celu opracowanie odpowiedniego modelu doświadczalnego na gryzoniach, aby można było badać zmiany w odpowiedzi na zarażenie *Cryptosporidium*. Opracowany model laboratoryjny stanowiły myszy szczepu C57/BL/6 poddawane supresji deksametazonem w dawce 0,25 ug/g masy ciała/dzień w wodzie do picia. W trakcie badań histopatologicznych określono, że pasożyt osiedla się w enterocytach jedynie w wybranych odcinkach jelita. Inwazja rozpoczyna się w jelicie czczym (*jejunum*), ale najintensywniej pasożyt zasiedlał jelito kręte (*ileum*) i kątnicę (*caecum*). Obecność stadiów endogennych pasożyta potwierdzano również testami immunofluorescencji bezpośredniej przy użyciu znakowanych przeciwciał klas IgA i IgG. Przeprowadzone badania eksperymentalne pozwoliły również stwierdzić, że izolaty *Cryptosporidium* uzyskane z prób środowiskowych, zarówno od bydła jak i drobnych gryzoni można pasażować w modelu eksperymentalnym oraz, że szczep myszy C57BL/6 jest dobrym modelem do badań nad przebiegiem zarażenia *C. parvum* w kontrolowanych warunkach doświadczalnych.

*Wyniki badań środowiskowych i opracowanie modelu laboratoryjnego dla Cryptosporidium parvum były podstawą badań związanych z realizacją pracy doktorskiej.*

- *Bednarska M, Bajer A, Siński E. 2008. Cryptosporidium parvum: the course of Cryptosporidium parvum infection in C57BL/6 mice co-infected with the nematode Heligmosomoides bakeri. Experimental Parasitology, 120:21-8.*

Przeprowadzone badania eksperymentalne miały na celu zbadanie wpływu zarażenia nicieniami jelitowymi na przebieg i dynamikę inwazji *Cryptosporidium* w kontrolowanych warunkach doświadczalnych u myszy C57BL/6 (Projekty BW: (i) Nr 1521/3 „Wpływ różnych dawek inwazyjnych *Heligmosomoides polygyrus* na przebieg zarażenia *C. parvum* u myszy

laboratoryjnych C57BL/6 (ii) Nr 1561/5 ‘Wpływ hormonów na przebieg zarażenia *C. parvum* podczas inwazji *H. polygyrus* u myszy laboratoryjnych C57BL/6”) Analizy wykazały, że inwazja nicienia *H. polygyrus* ma immunomodulacyjny wpływ na przebieg zarażenia *C. parvum* u myszy C57BL/6. W trakcie koinwazji samice wydają dwu- lub trzykrotnie większą liczbę oocyst niż samce, podczas gdy w zarażeniu jednym gatunkiem- *C. parvum* różnice między płcią żywiciela nie były istotne statystycznie. Zarażenie *H. polygyrus* wpływa na ograniczenie ostrej fazy i przyczynia się do wydalania podobnej liczby oocyst w trakcie całego eksperymentu u myszy, chociaż u samców na kilkakrotnie niższym poziomie. W pracy Bednarska i wsp. (2008) przedstawiono analizę odpowiedzi TH-1 w przebiegu koinwazji *Cryptosporidium/Heligmomoides*. Wykazano kluczową rolę IFN- $\gamma$  w odporności myszy na ostry rozwój inwazji *Cryptosporidium* oraz modulujący wpływ inwazji *H. polygyrus* na syntezę tej cytokiny. Przeanalizowano również rolę IL-12, której znaczenie było szczególnie istotne w ograniczeniu jednogatunkowej inwazji *C. parvum* i zależało od płci żywiciela - ograniczenie intensywności zarażenia obserwowanego u samców myszy C57BL/6. Analiza stężenia cytokin wytwarzanych przez komórki śledziony potwierdziła związek IL-12 i IFN $\gamma$  w regulacji zarażenia *C. parvum* w modelu laboratoryjnym. Przeprowadzone badania były jednymi z pierwszych stwierdzające, że zarażenie *H. polygyrus* wywołuje wzrost intensywności inwazji *C. parvum* i kształtuje jej chroniczny charakter, a *C. parvum* zwiększa przeżywalność nicieni *H. polygyrus* w czasie koinwazji obu gatunkami. Ponadto stwierdziłam wpływ pasożytów na immunologiczne mechanizmy efektorowe w przebiegu badanej koinwazji.

Otrzymane wyniki potwierdziły obserwacje środowiskowe, że chroniczne zarażenie *C. parvum* u wolno żyjących gryzoni jest warunkowane współwystępowaniem innych gatunków pasożytów, m.in. nicieni.

#### OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA

Prace prowadzone po uzyskaniu stopnia doktora dotyczyły zagadnień związanych z charakterystyką mikropasożytów jelitowych u ludzi i te badania stanowią moje osiągnięcie habilitacyjne. Inne najważniejsze kierunki badań realizowane w tym okresie przeze mnie związane są z (i) pasożytem *Babesia microti* w badaniach doświadczalnych i środowiskowych (ii) występowaniem u ludzi patogenów przenoszonych przez kleszcze, (iii) biologią hemopasożytów i pasożytów jelitowych zwierząt hodowlanych i dziko żyjących.

##### (i) *Babesia microti* – badania doświadczalne i środowiskowe

- Welc-Falęciak R, Bajer A, **Bednarska M**, Paziewska A, Siński E. 2007. Long term monitoring of *Babesia microti* infection in Balb/c mice using nested PCR. *Ann Agric Environ Med*, 14:265-270
- Mierzejewska E, Welc-Falęciak R, **Bednarska M**, Rodo A, Bajer A. 2014. The first evidence for the vertical transmission of *Babesia canis* in a litter of Central Asian Shepherd dogs. *Ann Agric Environ Med*, 21: 500-503.
- Sonnleitner ST, Fritz J., **Bednarska M**, Baumgartner R, Simeoni J, Zelger R, Schennach H, Lass-Flörl C, Edelhofer R, Pfister K, Milhakov A, Walder G. 2014. Risk-assessment of transfusion-

associated Babesiosis in Tyrol: Appraisal by Seroepidemiology and PCR. *Transfusion*, 54: 1725-32.

- Sonnleitner ST, Baumgartner R, Edelhofer R, Schennach H, **Bednarska M**, Pfister K, Walder G. 2014. Are *Babesia* a risk factor for blood products in an alpine area? *Parasit Vectors* 7 (Suppl 1): O37.
- **Bednarska M**, Bajer A, Drozdowska A, Mierzejewska EJ, Tolkacz K, Welc-Fałęciak R. 2015. Vertical Transmission of *Babesia microti* in BALB/c Mice: Preliminary Report. *PLoS ONE* 10(9): e0137731.
- Tolkacz K, **Bednarska M**, Alsarraf M, Dwuznik D, Grzybek M, Welc-Fałęciak R, Behnke JM, Bajer A. 2017. Prevalence, genetic identity and vertical transmission of *Babesia microti* in three naturally infected species of vole, *Microtus* spp. (Cricetidae). *Parasit Vectors*, 10:66.

*Babesia microti* jest pierwotniakiem, pasożytem lokalizującym się w erytrocytach ssaków i ptaków, natomiast kleszcz *Ixodes ricinus* jest wektorem przenoszącym go pomiędzy żywicielami. Do zarażenia ludzi dochodzi nie tylko po żerowaniu kleszcza, ale także w trakcie transfuzji krwi i produktów krwiopochodnych lub podczas transplantacji narządów. Istnieje również kilka doniesień na temat wrodzonego zarażenia *B. microti* u ludzi natomiast nieznane są czynniki wpływające na ryzyko ich wystąpienia.

Pasaż *B. microti* (szczep King 67) na myszach BALB/c jest prowadzony w Zakładzie Parazytologii pod moim nadzorem. Badania, które przeprowadzono w roku 2007 (Welc-Fałęciak i wsp.) potwierdziły, że ten model 'mysi' *B. microti* pasażowany w Zakładzie Parazytologii może być wykorzystany do długoterminowych badań inwazji pasożytniczej.

Transmisja pionowa jest zjawiskiem obserwowanym u wielu gatunków pasożytów i ich żywicieli. Zarażenie wertykalne następuje poprzez przeniesienie pasożyta z matki na potomstwo w czasie ciąży (np. *Toxoplasma gondii*), urodzenia dziecka (*Trichomonas vaginalis*) lub laktacji (*Toxocara canis*). Wrodzone inwazje mogą powodować powikłania w czasie ciąży, poronienia lub zarażenie płodu. Transmisja pionowa pasożytów może mieć negatywny wpływ na ontogenezę i powodować wrodzone wady potomstwa. Ta droga zarażenia została opisana u pierwotniaków z rodzaju *Babesia*, *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Trypanosoma* i dla nicieni z rodzaju *Toxocara*, *Ascaris* i *Strongyloides*. Przeniesienie *Babesia* spp. od samic do jej potomstwa odnotowano u ssaków: bydła (*B. divergens*), owiec (*B. ovis*), psów (*B. gibsoni*) i koni (*B. caballi*, *B. equi*). Nasze badania środowiskowe w Zakładzie Parazytologii pozwoliły opisać pierwszy przypadek transmisji pionowej *B. canis* u psów w Polsce.

Nasze badania opisane poniżej są pierwszymi w dobrze kontrolowanych warunkach laboratoryjnych u myszy BALB/c i miały one na celu określenie występowania i sukcesu transmisji pionowej *B. microti* w zależności od fazy rozwojowej pasożyta oraz etapu rozwojowego ciąży, w którym może dojść do zarażenia. Wstępne badania eksperymentalne (Bednarska i wsp. 2015) wykazały, że w czasie ciąży u myszy zarażonych *B. microti* dochodzi do transmisji pionowej pasożyta, skutkiem czego jest identyfikacja bezobjawowego zarażenia w pokoleniu F1. Nasze badania po raz pierwszy pokazały, że zarażenie wrodzone u potomstwa występuje gdy ciąża przebiega u samic z inwazją chroniczną. Rozwój ciąży podczas ostrej



babeszjozy nie był możliwy, co wskazywało, że inwazja *Babesia* w początkowym etapie zarażenia skutkuje utratą/resorpcją/poronieniem płodów w naszym modelu eksperymentalnym.

Dalsze badania były kontynuowane w ramach grantu NCN (2014/13/B/NZ7/02348). Przy współpracy z Katedrą Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej SGGW wykonane zostały badania histopatologiczne. Ponadto po raz pierwszy na świecie zastosowano techniki ultrasonograficzne, w badaniu transmisji pionowej *B. microti*: (i) badanie USG (aparat Esaote MayLab One), wykonywane w przychodniach weterynaryjnych przy użyciu sondy liniowej o częstotliwość 18 MHz i głębokości penetracji 3-4 cm (ii) oraz nowoczesną technikę ultrasonografii wysokiej rozdzielczości HFU (z ang. *High Frequency Ultrasound*) o rozdzielczości przestrzennej rzędu 30 µm przy głębokości penetracji fali do kilku milimetrów (współpraca z Instytutem Biologii Doświadczalnej PAN w Warszawie).

Analiza uzyskanych wyników pozwoliła stwierdzić, że: (1) wertykalna inwazja pasożyta jest możliwa gdy myszy (matki) są zarażone *B. microti* w fazie chronicznej inwazji; (2) wertykalna inwazja pasożyta nie może skutecznie zachodzić gdy do zarażenia dochodzi w czasie istniejącej ciąży; (3) w badaniach histopatologicznych matek i płodów wykazano obecność pasożyta w śledzionie, wątrobie, nerkach, mózgu, sercu, płucach oraz w łożysku i macicy; (4) patologiczny przebieg ciąży u myszy, u których do zarażenia *B. microti* dochodzi w czasie istniejącej ciąży, jest zarówno wynikiem przebiegu ostrej fazy babeszjozy u matek (anemia, zaburzenia krążenia, niedotlenienie tkanek), jak i wewnątrzmacicznego zarażenia płodu; (5) urodzenie zdrowego potomstwa z wrodzonym, bezobjawowym zarażeniem *B. microti* może być związane z przekazywaniem przez samice specyficznych przeciwciał klasy IgM i IgG w czasie ciąży. W oparciu o uzyskane wyniki przygotowywane są obecnie publikacje.

Doświadczenia prowadzone na tym modelu laboratoryjnym stały się podstawą kilku prac licencjackich i magisterskich oraz obecnie powstającej pracy doktorskiej, której tematyka obejmowała również badania środowiskowe dotyczące transmisji pionowej *B. microti* u zarażonych norników (*Microtus* spp.), będących naturalnym rezerwuarem dla tego pasożyta. Celem naszych badań środowiskowych było ustalenie, czy przenoszenie wertykalne *B. microti* występuje u naturalnie zarażonych norników, u których utrzymuje się wysoka ekstensywność zarażenia tym pasożytem. Przebadano trzy gatunki norników: *Microtus arvalis*, *M. oeconomus* i *M. agrestis*, tym ok. 20% stanowiły ciężarne samice. Pozytywne wyniki PCR uzyskano dla 41% badanych norników. Najwyższą ekstensywność *B. microti* odnotowano u *M. arvalis* (45,2%), następnie u *M. oeconomus* (39,5%), a najniższe u *M. agrestis* (17,7%). Transmisja wertykalna została potwierdzona u 81% płodów pochodzących z miotów od *Babesia*-dodatnich ciężarnych samic. Wrodzona inwazja była bezobjawowa i nie obserwowano negatywnego wpływu na przeżywalność i prawidłowy rozwój w okresie do 3 tygodni po porodzie. Analiza 97 sekwencji *B. microti* pozwoliła na wyodrębnienie dwóch genotypów. Genotyp IRU1 (Jena – like strain) dominował u dorosłych osobników (78%), natomiast genotyp IRU2 (Munich – like strain) u płodów (73%). Jedną z hipotez zakłada, że szczep Munich - like ma większą zdolność do transmisji pionowej i rozwoju u młodych zwierząt, natomiast szczep Jena-like może wpływać

na utrzymywanie przewlekłego zarażenia u norników, ale ma mniejszy sukces w transmisji pionowej. Nasze wieloletnie badania środowiskowe wykazały, że proporcje w występowaniu tych dwóch szczepów *Babesia* u zwierząt zmieniają się na przestrzeni lat. Szczepy IRU1 i IRU2 i ocena ich stopnia patogeniczności wymagają dalszych badań.

Współpraca z prof. Kurtem Pfisterem z Uniwersytetu Ludwika i Maksymiliana w Monachium (Comparative Tropical Medicine and Parasitology, Veterinary Faculty) oraz dwutygodniowy staż w tej instytucji dotyczyły opracowania metody in-house IFAT opartej na surowicy myszy zarażonych *B. microti* (szczep King 67) pochodzących z pasażu prowadzonego w Zakładzie Parazytologii. Opracowana metoda została wykorzystana w badaniach epidemiologicznych, mających na celu określenie seroprewalencji *B. divergens* i *B. microti* u mieszkańców Tyrolu i oszacowanie ryzyka zarażenia *B. microti* u dawców krwi z tego terenu (Sonnleitner i wsp. 2014, Sonnleitner i wsp. 2015). Niebezpieczeństwo oddania krwi przez dawcę zarażonego *B. divergens* lub *B. microti* wyniosło odpowiednio 24,2% i 5,8% na 100 000 dawców krwi. Niniejsze badania pokazują, że miejscowa populacja Tyrolu styka się najczęściej z gatunkiem *B. divergens*, a w mniejszym stopniu z *B. microti*. Według naszej wiedzy, po raz pierwszy na tym terenie potwierdzono również kontakt z gatunkiem *B. venatorum*. Ze względu na dynamiczne zmiany w puli patogenów przenoszonych przez wektory, w tym przez kleszcze, zaleca się ponowną lub okresową ocenę ryzyka zarażeń chorobami odkleszczowymi przez transfuzję i wprowadzenie pasożyta do krwi na terenie przeprowadzonych badań oraz innych obszarach endemicznych.

(ii) Występowanie i różnorodność zarażeń/zakażeń przenoszonych przez kleszcze u osób z grup ryzyka.

Najnowsze badania realizowałam w zespole zajmującym się badaniami nad występowaniem i różnorodnością zarażeń/zakażeń przenoszonych przez kleszcze u osób zakażonych wirusem HIV oraz dawców krwi. Polska jest uznawana za obszar endemiczny dla kleszczy *Ixodes ricinus*, natomiast infekcje odkleszczowe są zaniedbywane w porównaniu z innymi powszechnymi zakażeniami związanymi z HIV. Ponadto niedoceniane jest niebezpieczeństwo przeniesienia patogenów odkleszczowych poprzez produkty krwiopochodne. Diagnostyka serologiczna u pacjentów zarażonych wirusem HIV jest dodatkowo skomplikowana z powodu obniżonej wartości predykcyjnej. Dlatego też, zastosowanie metod w których mikroorganizm jest wykrywany bezpośrednio, ma dużą wartość diagnostyczną. Celem naszych badań było oszacowanie seroprewalencji oraz wykrycie DNA sześciu patogenów przenoszonych przez kleszcze u osób zakażonych HIV i dawców krwi w Polsce (*B. burgdorferi* sl., *A. phagocytophilum*, *Ehrlichia* spp., *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. *Bartonella henselae*) metodami serologicznymi i molekularnymi. Próbkę analizowano pod kątem obecności przeciwciał przeciwko sześciu patogenom przenoszonym przez kleszcze, a wskaźniki seropowalencyjności porównywano statystycznie między dwiema badanymi grupami, a także pod względem wieku, płci i limfocytów T CD4+ u pacjentów zakażonych HIV. Określono, że seroprewalencja zakażeń przenoszonych przez kleszcze u pacjentów zakażonych HIV jest wyższa niż u zdrowej populacji

w Polsce, chociaż nie zaobserwowano związku między serologicznym stanem pacjentów a poziomem limfocytów T CD4+. Nasze badania ujawniły pierwszy przypadek u zakażonego HIV pacjenta infekcji *A. phagocytophilum*- czynnika anaplazmozy granulocytów u ludzi (HGA) oraz jeden przypadek infekcji *Borrelia garinii*. Bezobjawowe zakażenie kleszczowe może wystąpić u pacjentów zakażonych HIV. Szczegółową historię ukąszeń przez kleszcze, szczególnie w endemicznych obszarach kleszczowych, należy traktować jako część wywiadu w rutynowej klinicznej opiece nad pacjentami zakażonymi wirusem HIV.

### (iii) Inne kierunki badań

Badania środowiskowe realizowałam w zespołach zajmujących się określaniem roli kleszczy i innych wektorów w transmisji patogenów chorobotwórczych dla ludzi i zwierząt oraz biologią hemopasożytów i pasożytów jelitowych zwierząt hodowlanych i dziko żyjących.

Jednym z realizowanych zagadnień była charakterystyka pasożytów u kolcomyszy arabskiej *Acomys dimidiatus* w czterech, częściowo izolowanych, suchych dolinach (wadis) znajdujących się w masywie Synaju w Egipcie (Wadi ElArbaein, W. Gebal, W. Tlah, W. Gharaba). Badania były częściowo finansowane z projektu OPUS NCN nr 2011/03/B/NZ6/02090 pt. „Badania środowiskowe, opis i charakterystyka biologiczna nowego gatunku *Babesia*, odkrytego u gryzoni z masywu Synaju (Egipt)”, 2012-2015, w którym byłam głównym wykonawcą.

- Bajer A, Harris PD, Behnke JM, **Bednarska M**, Barnard C, Sherif N, Clifford S, Gilbert FS, Siński E, Zalat S. 2006. Marked local variation of haemoparasites and arthropod vectors, and intestinal protozoa in spiny mice (*Acomys dimidiatus*) from four montane wadis in the St. Katherine Protectorate, Sinai, Egypt. *J Zool*, 270: 9-24.
- Bajer A, Alsarraf M, **Bednarska M**, Mohallal EM, Mierzejewska EJ, Behnke-Borowczyk J, Zalat S, Gilbert F, Welc-Falęciak R, 2014. *Babesia behnkei* sp nov., a novel *Babesia* species infecting isolated populations of Wagner's gerbil, *Dipodillus dasyurus*, from the Sinai Mountains, Egypt. *Parasit Vectors*, 7:572.
- Alsarraf M, **Bednarska M**, Mohallal EM, Mierzejewska EJ, Behnke-Borowczyk J, Zalat S, Gilbert F, Welc-Falęciak R, Kloch A, Behnke JM, Bajer A. 2016. Long-term spatiotemporal stability and dynamic changes in the haemoparasite community of spiny mice (*Acomys dimidiatus*) in four montane wadis in the St. Katherine Protectorate, Sinai, Egypt. *Parasit Vectors*, 8:9:195.
- Alsarraf M, Mohallal EME, Mierzejewska EJ, Behnke-Borowczyk J, Welc-Falęciak R, **Bednarska M**, Dziewit L, Zalat S, Gilbert F, Behnke JM, Bajer A. 2017. Description of *Candidatus Bartonella fadhilae* n. sp. and *Candidatus Bartonella sanaae* n. sp. (Bartonellaceae) from *Dipodillus dasyurus* and *Sekeetamys calurus* (Gerbillinae) from the Sinai Massif (Egypt). *Vector Borne Zoonotic Dis*, 17:483-494.

Badania były prowadzone na przestrzeni 12 lat (w latach: 2000, 2004, 2008, 2012). W badaniach oceniano ekstensywność i intensywność zarażeń hemopasożytami i występowanie ich potencjalnych wektorów oraz inwazje dwoma wybranymi gatunkami pierwotniaków jelitowych. Porównywano różnice w inwazjach pasożytniczych w poszczególnych dolinach,

które są naturalnie częściowo izolowane od siebie. Analizy mikroskopowe i molekularne umożliwiły (i) oszacowanie różnorodności gatunkowej organizmów pasożytniczych (hemopasożytów, pasożytów jelitowych i ektopasożytów) dla tego gatunku żywiciela, (ii) identyfikację i opisanie nowego gatunku pasożyta krwi *Babesia behnkei*, (iii) monitorowanie długoterminowych trendów w społeczności hemopasożytów myszy kolczastych (*A. dimidiatus*) i określenie głównych czynników odpowiedzialnych za zmiany w okresie 12 lat badań. Obserwowano dynamiczne zmiany cykli występowania i częstości zarażeń różniących się w zależności od gatunku pasożyta. Jedną z postawionych hipotez zakłada, że skutki 15-letniego niedoboru opadów (przeciągające się susze) w lokalnych środowiskach dolin mogły być przyczyną ograniczenia transmisji pasożytów, m. in. przez negatywny wpływ na przeżycie wektora.

*M. Bednarska*