Załącznik 2

Warszawski Uniwersytet Medyczny
I Wydział Lekarski
Katedra i Zakład Biologii Ogólnej i Parazytologii
ul. Chałubińskiego 5
02-004 Warszawa

Autoreferat przedstawiający opis osiągnięć naukowych w związku z ubieganiem się o nadanie stopnia doktora habilitowanego

dr n. med. Monika Dybicz

Warszawa 2019

Spis treści

1. Dane Osobowe ……...……3

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe/artystyczne - z podaniem nazwy, miejsca i roku uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej ……..……3

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu …….……3

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

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego ……..4

4.2. Wykaz publikacji stanowiących podstawę rozprawy habilitacyjnej ……...4

4.3. Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania ……...6

4.3.1. Omówienie publikacji dotyczących badań nad spornymi diagnostycznie czynnikami etiologicznymi bąblowicy człowieka w Polsce …….7

4.3.2. Omówienie publikacji dotyczących badań nad zróżnicowaniem pierwotniaków z rodzaju *Trichomonas* identyfikowanych w jamie ustnej człowieka i zwierząt ……14

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych habilitanta we wszystkich obszarach wiedzy ……...……..18

5.1. Badania patogenów transmitowanych przez szkodniki żywności *Plodia interpunctella* .18

5.2. Badania zagrożeń zdrowia publicznego indukowanych przez ameby amfizoiczne ….…21

5.3. Badania nicieni na modelu eksperymentalnym myszy …….……23

5.4. Badania microbiota jamy ustnej u pacjentów z zaburzeniami układu żucia …….24

5.5. Badania stawonogów z rodzaju *Demodex* …….25

5.6. Pozostałe osiągnięcia związane z działalnością popularyzatorską i dydaktyczną ……25

6. Piśmiennictwo ……..……27

1. Dane Osobowe

Imię i nazwisko: Monika Dybicz
Zajmowane stanowisko: Adiunkt
Miejsce pracy: Katedra i Zakład Biologii Ogólnej i Parazytologii,
ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa, Warszawski Uniwersytet Medyczny

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

17.VI.2004 - stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej, uzyskany z wyróżnieniem w Centrum Biostruktury Akademii Medycznej w Warszawie.
Temat pracy: Znaczenie metody PCR-RFLP w wykrywaniu i różnicowaniu gatunków rzęsistków jamy ustnej.
Promotor: Prof. dr hab. Barbara Grytner-Zięcina
Recenzenci: Prof. dr hab. Maria Nowaczyk, Prof. dr hab. Piotr Kurnatowski

26.VI.2000 - dyplom Magistra Biotechnologii uzyskany w SGGW na Międzywydziałowym Studium Biotechnologii w zakresie Biotechnologii w produkcji i ochronie zdrowia zwierząt.
Tytuł pracy magisterskiej: Diagnostyka rzęsistkowicy jamy ustnej człowieka i zwierząt domowych.

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu

1.X.2009 - nadal Adiunkt w Katedrze i Zakładzie Biologii Ogólnej i Parazytologii, I Wydz. Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny.
1.X.2004 - Adiunkt w Zakładzie Biologii Ogólnej i Parazytologii, I Wydział Lekarski, Akademia Medyczna w Warszawie.
1.X.2000 - Asystent w Zakładzie Biologii Ogólnej i Parazytologii, I Wydział Lekarski, Akademia Medyczna w Warszawie.

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

Osiągniecie naukowe zgłoszone do postępowania habilitacyjnego stanowi cykl prac składający się z 7 publikacji.

Wartość bibliometryczna tych prac wynosi 150 pkt. MNiSW, IF 10.489, w tym jako pierwszy autor: 120 pkt. MNiSW, IF 7.944.

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego.

Przydatność badań molekularnych w identyfikacji gatunków patogenicznych dla człowieka oraz weryfikacji zróżnicowania genotypów pochodzących z materiałów klinicznych i odzwierzęcych.

4.2. Wykaz publikacji stanowiących podstawę rozprawy habilitacyjnej.

Publikacje stanowiące podstawę rozprawy habilitacyjnej dotyczą dwóch obszarów badawczych, które łączy zastosowanie technik molekularnych jako głównej metody identyfikacji/weryfikacji słabo poznanych, wątpliwych lub spornych diagnostycznie gatunków patogenicznych dla człowieka.

Listę prac tworzących cykl uporządkowano chronologicznie, od najstarszych do najnowszych z numerami od 1 do 7.

1. Dybicz M (autor koresp), Gierczak A, Dabrowska J, Rdzanek T, Michałowicz B. Molecular diagnosis of cystic echinococcosis in humans from central Poland. Parasitol Int 2013; 62(4): 364-367. 2.111 IF; 25 pkt. MNiSW

2. Dybicz M (autor koresp), Borkowski PK, Dąbrowska J, Chomicz L. Cases of *Echinococcus granulosus* sensu stricto isolated from Polish patients: imported or indigenous? BioMed Res Int 2015; 2015, Article ID 728321. 2.134 IF; 20 pkt. MNiSW

3. Laurimäe T, Kinkar L, Romig T, Omer RA, Casulli A, Umhang G, Gasser RB, Jabbar A, Sharbatkhori M, Mirhendi H, Ponce-Gordo F, Lazzarini LE, Soriano SV, Varcasia A, Rostami Nejad M, Andresiuk V, Maravilla P, González LM, **Dybicz M**, Gawor J, Šarkūnas M, Šnábel V, Kuzmina T, Saarma U. The benefits of analysing complete mitochondrial genomes: Deep insights into the phylogeny and population structure of *Echinococcus granulosus* sensu lato genotypes G6 and G7. Infec Genet Evol 2018; 64: 85-94. 2.545 IF; 30 pkt. MNiSW

4. Dybicz M (autor koresp), Borkowski PK, Padzik M, Baltaza W Chomicz L. Molecular determination of suspected alveolar echinococcosis requiring surgical treatment in human cases from Poland. Ann Parasitol 2018; 64(4): 339-342. 15 pkt. MNiSW

5. Dybicz M. (autor koresp.), Perkowski K, Sędzikowska A, Baltaza W, Chomicz L. Studies on prevalence of infection with *Trichomonas tenax* identified by molecular techniques – in respect to oral health of patients with various systemic disease requiring immunosuppressive therapy. Ann Parasitol 2018; 64(3): 193-197. 15 pkt. MNiSW

6. Dybicz M (autor koresp.), Perkowski K, Baltaza W, Padzik M, Sędzikowska A, Chomicz L. Molecular identification of *Trichomonas tenax* in the oral environment of domesticated animals in Poland - potential effects of host diversity for human health. Ann Agric Environ Med 2018; 25(3): 464-468. 1.116 IF; 20 pkt. MNiSW

7. Dybicz M (autor koresp.), Borkowski PK, Jonas M, Wasiak D, Małkowski P. First record of *Echinococcus ortleppi* in human cases of cystic echinococcosis in Poland. Biomed Res Int 2019; 2019, Article ID 2474839. 2.583 IF; 25 pkt. MNiSW

W załączeniu:

- Kopie prac stanowiących osiągnięcie naukowe oraz oświadczenia współautorów o indywidualnym wkładzie autorskim - załącznik 6.

4.3. Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Cel prac

W skład osiągnięcia, wynikającego z art. 16 ust. 2, wchodzi 7 publikacji, które dotyczą badań molekularnych nad słabo poznanymi, wątpliwymi lub spornymi diagnostycznie gatunkami patogenicznymi dla człowieka.

Cel badań stanowiło opracowanie nowych metod molekularnych oraz zweryfikowanie wcześniejszych badań. Dzięki zastosowaniu metod molekularnych (PCR, sekwencjonowanie) przeprowadzono analizę zróżnicowania genotypów/szczepów organizmów patogennych uzyskanych z materiałów klinicznych i odzwierzęcych.

Uwzględniono badania nad:

- diagnostycznie spornymi i wcześniej nieznanymi w Polsce czynnikami etiologicznymi bąblowic człowieka - omówione w podrozdziale 4.3.1.;
- zróżnicowaniem i skutkami dyspersji w środowisku, identyfikowanych w jamie ustnej pierwotniaków z rodzaju *Trichomonas* - omówione w podrozdziale 4.3.2.

Założono, że wyniki, uzyskane z zastosowaniem technik molekularnych ułatwią identyfikację genotypu/szczepu pasożyta, a w przypadkach genotypów diagnostycznie niejednoznacznych umożliwią ich weryfikację oraz monitorowanie ich dyspersji w środowisku człowieka, istotnej dla oceny zagrożenia epidemiologicznego. Badania te stanowią wkład w oczekiwany postęp w działaniach praktycznych, prowadzących do poprawy diagnostyki, postępowania terapeutycznego oraz skuteczności zapobiegania zagrożeniom ludzkiego zdrowia indukowanym przez badane gatunki.

Prowadzone przeze mnie badania były wykonane we współpracy z Klinikami i Zakładami Wydziału Lekarskiego (Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej, Transplantacyjnej i Wątroby, Klinika Chorób Zakaźnych, Tropikalnych i Hepatologii, Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej i Transplantacyjnej), Wydziału Nauk o Zdrowiu (Zakład Biologii Medycznej, Zakład Pielęgniarstwa Chirurgicznego, Transplantacyjnego i Leczenia Pozaustrojowego), Wydziału Lekarsko-Dentystycznego (Zakład Ortodoncji), a także we współpracy z ośrodkami zagranicznymi: Department of Zoology, Institute of Ecology and Earth Sciences, University of Tartu, Estonia oraz Department of Infectious Diseases, Italian National Institute of Health, Italy.

4.3.1. Omówienie publikacji dotyczących badań nad spornymi diagnostycznie czynnikami etiologicznymi bąblowicy człowieka w Polsce.

Bąblowica jednojamowa (CE – cystic echinococcosis) jest chorobą odzwierzęcą rozprzestrzenianą na całym świecie, wywoływaną przez tasiemce *Echinococcus granulosus* sensu lato. W cyklu życiowym gatunków *Echinococcus* ostatecznymi żywicielami są głównie domowe psy, jednak dzikie psowate (wilki, szakale, kojoty, lisy), kotowate i hienowate mogą również odgrywać ważną rolę w transmisji. Dorosły tasiemiec (o długości 3 - 6 mm) żyje w jelicie cienkim i produkuje jaja wydalane z kałem. Pośredni żywiciele (owce, kozy, trzoda chlewna, bydło, konie, wielbłądy lub przypadkowo ludzie) spożywają jaja, które rozwijają się w larwy w narządach wewnętrznych. W tych narządach onkosfera przekształca się w torbiel, która powiększa się produkując protoskoleksy. Ostateczny żywiciel zaraża się przez połknięcie organów zawierających torbiele zarażonego żywiciela pośredniego. Po spożyciu protoskoleksy wynicowują, przyczepiają się do błony śluzowej jelit i rozwijają się w dorosłe tasiemce w ciągu 32 do 80 dni.

Torbiele u ludzi rozwijają się najczęściej w wątrobie, płucach, mózgu, sercu i kościach (Pawlowski i wsp. 2001, McManus i wsp. 2003). W bąblowicy ludzkiej torbiel zwykle rozwija się bezobjawowo przez lata, dopóki nie zacznie naciskać na otaczające tkanki i powodować niespecyficzne objawy. Leczenie CE uważa się za trudne ze względu na powikłania innych narządów i możliwość rozprzestrzeniania się płynu wraz z protoskoleksami podczas operacji. Zarówno niedostateczna resekcja, jak i pęknięcie pęcherza mogą przyczyniać się do anafilaksji, nawrotów i wielokrotnego wtórnego CE.

Echinokokoza jest uważana za narastającą chorobę, występującą na całym świecie z największą prewalencją w części Eurazji, północnej i wschodniej Afryki, Australii i Ameryce Południowej (Jenkins i wsp. 2005). W Polsce echinokokoza nie jest uważana za częstą chorobę. Według Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego liczba zarejestrowanych przypadków u ludzi wynosi od 20 do 60 rocznie.

Analiza molekularna, oparta głównie na genach mitochondrialnych (Nakao i wsp. 2006), wykazała, że *E. granulosus* jest kompleksem wielu gatunków różniących się specyficznością gospodarza, patologią, tempem rozwoju i wrażliwością na chemioterapeutyki. Zmiany taksonomiczne na podstawie analizy genetycznej doprowadziły do wyodrębnienia *E. granulosus* sensu stricto (genotypy G1-G3), *Echinococcus equinus* (G4), *Echinococcus ortleppi* (G5), *Echinococcus canadensis* (G6-G10) i *Echinococcus felidis* (Thompson 2008).

Dzięki zastosowaniu technik molekularnych możliwe stało się wykrywanie organizmów występujących w bardzo małej liczbie poniżej progu wykrywalności oraz różnicowanie szczepów/genotypów identycznych morfologicznie czy obumarłych organizmów, których część materiału genetycznego przetrwała. Określenie genotypu pasożyta warunkuje jego patogeniczność, lekooporność i wybór odpowiedniego leczenia. W poszczególnych publikacjach dotyczących bąblowicy człowieka (publikacje 1-4, 7), stanowiących podstawę rozprawy habilitacyjnej, przeprowadzono badania molekularne w celu określenia czynnika etiologicznego bąblowicy w Polsce.

Pierwsze badania molekularne torbieli bąblowcowych zdiagnozowanych u człowieka w Polsce dotyczyły jedynie 4 opisanych przypadków (Kędra i wsp. 1999). Analiza fragmentu genomu mitochondrialnego wykazała obecność genotypu tzw. świńskiego oznaczonego jako G7.

W **publikacji nr 1** (**Molecular diagnosis of cystic echinococcosis in humans from central Poland**. Dybicz M, Gierczak A, Dabrowska J, Rdzanek T, Michałowicz B.) **przeprowadziłam badania molekularne dużej liczby larw bąblowców izolowanych od ludzi.** Zbadałam 47 torbieli pobranych po hepatektomii od pacjentów z centralnej Polski leczonych w latach 2000–2010. Większość torbieli miała rozmiar od 3 do 6 cm średnicy, najmniejsza - 1 cm, a największa 10 cm. W 1 przypadku zdiagnozowano 4 torbiele, a reszta występowała jako torbiel pojedyncza. Torbiele znaleziono w wątrobie z wyjątkiem 1 pacjentki, u której torbiele wykryto w wątrobie i śledzionie. **DNA wyizolowałam z fragmentów torbieli i przy wykorzystaniu wcześniej zaprojektowanych par starterów dla genów mitochondrialnych (*nad1* i *cox1*)** (Bowles i wsp. 1992, Bowles i McManus 1993) **opracowałam warunki PCR (Polymerase Chain Reaction – Łańcuchowa Reakcja Polimerazy).** Dzięki PCR potwierdziłam obecność *Echinococcus* w 30 przypadkach, wśród których było 21 kobiet i 9 mężczyzn ze średnią wieku 42 lat (od 18 do 75 lat). **Analiza sekwencji *nad1* wykazała identyczność ze szczepem G7 (świńskim), zwanym *Echinococcus canadensis***. Wszystkie sekwencje fragmentu genu *nad1* zostały zdeponowane w banku genów (GenBank) i nadano im numery JX266793 – JX266824. **Badania te potwierdziły, że szczep świński G7 tego pasożyta jest najczęstszym czynnikiem etiologicznym ludzkiej bąblowicy jednojamowej w środkowej Polsce.** Szczep G7 jest jednym z głównych genotypów wykrywanych u świń w wielu krajach europejskich, zwłaszcza we wschodniej i południowo-wschodniej Europie, głównie dlatego, że świnie są często hodowane w małych gospodarstwach rolnych w bliskim kontakcie z hodowcami i ich

rodzinami. W Polsce prewalencja *Echinococcus* sp. u świń badanych podczas uboju wynosiła 10,37% (Kozłowska-Łój i wsp. 2011).

W tej publikacji przebadane próby dotyczyły 47 pacjentów, u których wcześniejsze potwierdzenie bąblowicy technikami histopatologicznymi, obrazowymi oraz testami immunologicznymi było wątpliwe. Spośród nich w 27 przypadków wykryłam protoskoleksy i/lub haki pasożyta w preparatach bezpośrednich. Trzy kolejne próbki potwierdzono jako pozytywne za pomocą PCR. Wyniki te wykazały, że 64% pacjentów miało bąblowicę jednojamową, co ma ogromne znaczenie w ustawieniu leczenia. **Jest to pierwsze badanie tak dużej liczby torbieli izolowanych od ludzi w Polsce.**

W **publikacji nr 2** (**Cases of *Echinococcus granulosus* sensu stricto isolated from Polish patients: imported or indigenous?** Dybicz M, Borkowski PK, Dąbrowska J, Chomicz L.) **po raz pierwszy w Polsce wykryłam szczep G1 (owczy) *E. granulosus* u ludzi**. Zbadałam przypadki 9 polskich pacjentów ze zdiagnozowaną echinokokozą. Fragmenty torbieli pobrano pooperacyjnie w okresie od stycznia 2010 r. do maja 2015 r. w Zakładzie Chorób Odzwierzęcych i Tropikalnych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Niektórzy pacjenci leczeni byli albendazolem i byli pod nadzorem lekarza od wielu lat. Z powodu komplikacji torbiele usunięto chirurgicznie. Sześciu pacjentów stanowiły kobiety, a trzech mężczyzni. Wiek pacjentów wahał się od 26 do 77 lat. **Na podstawie mojej metody PCR opracowanej wcześniej i sekwencjonowania fragmentu genu *nad1* zidentyfikowałam *Echinococcus canadensis* G7 u 7 pacjentów i *E. granulosus* G1 u 2 pacjentów.** Wszystkie sekwencje fragmentu genu *nad1* zdeponowałam w banku genów pod numerami KT780293 – KT780301. **W pracy tej po raz pierwszy wykryto genotyp *E. granulosus* G1 (owczy) u polskich pacjentów**, co sugerować może, że pasożyt był importowany, ale nie wyklucza to możliwości, że te przypadki mogły mieć polskie pochodzenie. Genotyp *E. granulosus* G1 (owczy) jest kosmopolitycznym szczepem rozpowszechnionym na całym świecie i występującym szczególnie na obszarach ekstensywnej hodowli owiec. Jest to przeważający szczep inwazyjny dla ludzi. Jest to pierwszy raport potwierdzający bąblowicę *E. granulosus* sensu stricto izolowaną od ludzi w Polsce. Te przypadki dotyczyły kobiety i mężczyzny. Pacjentka z CE wątroby, opisaną jako szczep owczy w tomografii komputerowej, była leczona albendazolem. Torbiel miała dwie potomne cysty i po leczeniu albendazolem zaobserwowano odwarstwienie i obumarcie pasożyta. Rok później torbiel została usunięta chirurgicznie. W wywiadzie z pacjentką okazało się, że podróżowała do Turcji kilka lat temu i spędziła tam tydzień zanim

zdiagnozowano CE, co sugeruje możliwość zarażenia szczepem G1 za granicą. Drugi pacjent był operowany w 2001 r. w Kazachstanie z powodu torbieli wykrytej w mięśniu lewego biodra, ale rozpoznanie CE nie zostało potwierdzone przez badanie histopatologiczne ani żadne inne badanie. Po przesiedleniu do Polski, zdiagnozowano raka okrężnicy, a podczas tomografii zlokalizowano małe torbiele w lewym mięśniu biodrowym. Guz i torbiele usunięto i wysłano w celu potwierdzenia. Wstępna identyfikacja *E. granulosus* G1 w tym przypadku, biorąc pod uwagę historię pacjenta, sugeruje, że przypadek ten został importowany z Kazachstanu, gdzie przeważa szczep G1. Fakt ten nie wyklucza ryzyka zarażenia różnych gospodarzy przez *E. granulosus* G1 lub inne szczepy w Polsce. Nadal jest brak wiedzy na temat rozmieszczenia wariantów genetycznych *Echinococcus* we wszystkich częściach kraju.

Publikacja nr 3 (**The benefits of analysing complete mitochondrial genomes: Deep insights into the phylogeny and population structure of *Echinococcus granulosus* sensu lato genotypes G6 and G7**. Laurimäe T, Kinkar L, Romig T, Omer RA, Casulli A, Umhang G, Gasser RB, Jabbar A, Sharbatkhori M, Mirhendi H, Ponce-Gordo F, Lazzarini LE, Soriano SV, Varcasia A, Rostami Nejad M, Andresiuk V, Maravilla P, González LM, **Dybicz M**, Gawor J, Šarkūnas M, Šnábel V, Kuzmina T, Saarma U.) **jest wynikiem współpracy ośrodków z całego świata, której celem było opracowanie metody molekularnej pozwalającej na jednoznaczne określenie genotypów *Echinococcus granulosus* sensu lato, do których należą blisko spokrewnione G6 i G7**, często wywołujące ludzką bąblowicę na całym świecie. Poprzednie badania na temat zmienności genetycznej G6 i G7 opierały się na stosunkowo krótkich sekwencjach mitochondrialnego DNA, a rozdzielczość tych badań była często niska.

Celem pracy było **sekwencjonowanie kompletnych genomów mitochondrialnych (mitogenomów)**, aby uzyskać głębszy wgląd w różnorodność genetyczną, filogenezę i strukturę populacji genotypów G6 i G7. Zsekwencjonowano pełne mitogenomy 94 próbek pobranych z 15 różnych krajów na całym świecie, w tym 5 prób z Polski pochodzących z mojej kolekcji. Wyniki wykazały, że **genotypy G6 i G7 można wyraźnie odróżnić, gdy stosowane są sekwencje mitogenomowe**. **Sekwencje mitogenomów polskich prób definitywnie potwierdziły przynależność do genotypu G7**.

W publikacji nr 7 (First record of *Echinococcus ortleppi* in human cases of cystic echinococcosis in Poland. Dybicz M, Borkowski PK, Jonas M, Wasiak D, Małkowski P.) zbadałam 5 torbieli od ludzi i wykorzystując poprzednią metodę analizy genów mitochondrialnych, **wykryłam 1 przypadek *Echinococcus ortleppi* G5, szczep bydlęcy**.

Wszystkie sekwencje zarejestrowałam w banku genów pod numerami MH492787 – MH492792. *E. ortleppi* to rzadki genotyp *Echinococcus* uważany za wymarły gatunek (Romig i wsp. 2006). **Badania te potwierdzają pierwszy przypadek *E. ortleppi*, powodującego ludzką bąblowicę w Polsce, gdzie najczęstszym czynnikiem etiologicznym jest *E. canadensis***.

Ten przypadek *E. ortleppi* dotyczył 38-letniej kobiety, która mieszka w domu z własnym ogrodem warzywnym w pobliżu lasu, skąd leśne zwierzęta mają dostęp. Pacjentka jest pracownikiem biurowym bez bogatej historii podróży - raz odwiedziła Niemcy. U pacjentki zdiagnozowano torbiel (o średnicy 12 cm) z grubą ścianą około 3 mm w prawym płacie wątroby. W badaniu tomografii komputerowej torbiel została opisana jako prawdopodobnie ulegająca rozkładowi, zwapniała i nie wykazywała żadnych specyficznych cech różniących ją od torbieli *E. canadensis*, rozpoznawanych najczęściej w Polsce. Zarażenie *E. ortleppi* powodujące ludzką CE jest rzadko diagnozowane, chociaż genotyp G5 był już opisywany u ludzi w Holandii, Francji, Argentynie, Brazylii, Meksyku, Indiach, Wietnamie i Południowej Afryce (Grenouillet i wsp. 2014, Sharma i wsp. 2013, Van De i Le Van 2017, de la Rue i wsp. 2011, Avila i wsp. 2017, Mogoye i wsp. 2013). Jak sugerowali niektórzy autorzy, *E. ortleppi* jest ginącym gatunkiem w Europie z powodu małej możliwości transmisji pasożyta między bydłem a psami. Jednak *E. ortleppi* odnotowano również u zwierząt gospodarskich, przeżuwaczy, wielbłądów, bawołów, jeleni, małp i jeżozwierzy, dlatego nasz polski przypadek *E. ortleppi* może pochodzić od świni.

Wyżej wymienione publikacje dotyczyły przypadków bąblowicy jednojamowej (CE – cystic echinococcosis) - zoonozy występującej na całym świecie, wywoływanej przez tasiemce z kompleksu *Echinococcus granulosus* sensu lato. CE rozprzestrzeniana jest przez ostatecznych żywicieli (domowe psy, dzikie psowate, kotowate i hienowate), a żywiciele pośredni to owce, kozy, trzoda chlewna, bydło lub przypadkowo ludzie.

Ostatnia praca z cyklu – **publikacja nr 4** (**Molecular determination of suspected alveolar echinococcosis requiring surgical treatment in human cases from Poland**. Dybicz M, Borkowski PK, Padzik M, Baltaza W Chomicz L.) **dotyczy *Echinococcus multilocularis***, którego głównym żywicielem ostatecznym są dzikie zwierzęta mięsożerne (lis, wilk). Możliwe, że w cyklu synantropijnym dorosłe tasiemce mogą rozwijać się u kotów i psów domowych. Dorosła postać (o długości 1,2 – 3,7 mm), żyje w jelicie cienkim żywiciela, który wydala jaja tasiemca wraz z kałem.

Larwa *E. multilocularis* w żywicielu pośrednim (gryzonie) jest strukturą naciekającą przypominającą guz; wzrost larwy pozostaje na etapie proliferacji, w wyniku inwazji otaczających tkanek. Larwa może tworzyć rozgałęzienia rozciągając się na dotknięty narząd, głównie wątrobę. Przedłużony okres bezobjawowej inwazji, przewlekły przebieg, powolny wzrost naciekowej larwy powodują trudności w diagnostyce. *E. multilocularis* powoduje bąblowicę wielojamową (AE – alveolar echinococcosis) - poważną chorobę odzwierzęcą, o wysokiej śmiertelności (90% w przypadkach nieleczonych). Torbiele mogą być błędnie zdiagnozowane jako rak wątroby i leczone nieprawidłowo.

W Polsce obserwowany jest wzrost częstości występowania *E. multilocularis*, co jest najprawdopodobniej wynikiem wzrostu populacji lisów (z 67 000 w 1995 r. do ponad 200 000 w 2006 r.) (Malczewski i wsp. 2008, Karamon i wsp. 2014, Nahorski i wsp. 2013). Prawdopodobnie ekspansja gatunku lisa, podobnie jak w innych krajach europejskich, związana jest z kampaniami przeciw wściekliźnie. Zwiększona liczba zarażonych lisów jest niewątpliwie przyczyną rosnącej liczby przypadków alweokokozy u ludzi. Większość przypadków AE u ludzi odnotowano na obszarach odpowiadających regionom inwazji *E. multilocularis* w populacji lisów. Na podstawie danych epidemiologicznych określono, że czynnikami ryzyka ludzkiej bąblowicy wielojamowej są posiadanie psa lub kota, polowanie, rolnictwo, ogrodnictwo i jedzenie żywności skażonej jajami *Echinococcus*.

W publikacji nr 4 zbadałam 5 przypadków bąblowicy wielojamowej niepotwierdzonej na podstawie technik obrazowych i testów serologicznych. Próbki tkanek pasożyta pobranych okołooperacyjnie ze zmian wątrobowych wykorzystano do badań molekularnych. **Sekwencje fragmentu genu *nad1* wszystkich izolatów były identyczne z *E. multilocularis*.** Sekwencje zdeponowałam w banku genów pod numerami JX266825, JX266826, MH986749 – MH986751.

Wyniki potwierdzają, że stosowanie technik obrazowych może być niewystarczające do zdiagnozowania bąblowca, zatem rozpoznanie choroby powinno opierać się na kilku procedurach; szczególnie cenne są wysoce czułe i specyficzne metody molekularne, które jednoznacznie potwierdzają genotyp pasożyta, co ma ogromne znaczenie w leczeniu bąblowicy, ponieważ w przypadku zarażenia w celu skutecznego zapobiegania w rozprzestrzenianiu się pasożyta w ciele zarażonej osoby konieczne jest przyjmowanie albendazolu przez całe życie.

Podsumowanie publikacji na temat czynników etiologicznych ludzkiej bąblowicy w Polsce.

Echinokokoza jest chorobą inwazyjną ludzi spowodowaną stadium larwalnym tasiemca ***Echinococcus granulosus* sensu lato (bąblowica jednojamowa; cystic echinococcosis - CE)** lub ***Echinococcus multilocularis* (bąblowica wielojamowa; alveolar echinococcosis - AE)**. Rozpoznanie echinokokozy opiera się na technikach obrazowych połączonych z testami serologicznymi, które nie są specyficzne. **Diagnostyczne metody molekularne, w tym PCR (Polymerase Chain Reaction - Łańcuchowa Reakcja Polimerazy), gwarantują czułość, specyficzność i zapewniają prawidłową diagnozę pasożyta, mając przewagę nad konwencjonalnymi metodami**. PCR jest obecnie szeroko stosowaną techniką w diagnostyce wielu chorób zakaźnych, w tym pasożytniczych, takich jak ameboza, malaria, filarioza itp. Stosowana jest również do diagnozowania bąblowców z użyciem prób płynu torbielowego.

W prezentowanych publikacjach opracowałam PCR i sekwencjonowanie genów mitochondrialnych w celu identyfikacji czynników powodujących ludzkie echinokokozy w Polsce. Przeanalizowałem wiele prób ludzkich torbieli i zweryfikowałam genotypy *Echinococcus.* **Wyniki wykazały:**

- **G7 (szczep świński), *Echinococcus canadensis***, jako główny czynnik etiologiczny ludzkiej bąblowicy jednojamowej w Polsce (publikacja nr 1-3, 7). W wielu regionach kraju świnie hoduje się w gospodarstwach w pobliżu mięsożernych żywicieli ostatecznych, zwłaszcza psów. Dlatego ludzie mający kontakt z tymi psami są często narażeni na szczep świński. Ponadto genotyp G7 ma krótszy okres dojrzewania u psów w porównaniu z innymi szczepami *Echinococcus,* co należy wziąć pod uwagę przy planowaniu leczenia przeciwrobaczego u psów.
- **G1 (szczep owczy), *Echinococcus granulosus* sensu stricto**, zidentyfikowany tylko u 2 polskich pacjentów, wciąż pod znakiem zapytania: importowane lub rodzime? (publikacja nr 2);
- **G5 (szczep bydlęcy), *Echinococcus ortleppi***, rzadki genotyp, uważany za gatunek wymarły, wykryty tylko u 1 pacjenta polskiego (publikacja nr 7);
- ***Echinococcus multilocularis*** potwierdzony w próbach ludzkich, niezweryfikowanych innymi metodami (publikacja nr 4).

Wszystkie sekwencje mitochondrialne badanych ludzkich izolatów *Echinococcus* zdeponowano w banku genów (GenBank) z numerami: JX266793 – JX266824, KT780293 – KT780301, MH492787 – MH492792, JX266825, JX266826, MH986749 – MH986751.

Genotypy *Echinococcus granulosus* sensu lato są morfologicznie i genetycznie różne; jednakże większość z nich może rozwijać się w zwierzętach, jak i ludziach, stwarzając zagrożenia dla zdrowia publicznego i hodowli zwierząt. Dlatego też konieczne jest badanie patologii i etiologii CE na podstawie identyfikacji molekularnej w celu oceny genotypu. Analiza molekularna umożliwia rozróżnianie izolatów *Echinococcus* i stanowi niezawodne narzędzie do wykrywania pasożytów i różnicowania gatunków lub szczepów.

Podsumowując, wysoce czułe i specyficzne metody molekularne są cenne i jednoznacznie potwierdzają genotyp pasożyta, który wywołuje bąblowicę w Polsce. Ma to duże znaczenie w doborze leczenia choroby, aby zapobiec rozprzestrzenianiu się pasożyta w organizmie.

4.3.2. Omówienie publikacji dotyczących badań nad zróżnicowaniem pierwotniaków z rodzaju *Trichomonas* identyfikowanych w jamie ustnej człowieka i zwierząt.

Rzęsistki z rodzaju *Trichomonas* należą do wiciowców prymitywnych ewolucyjnie. Pierwotniaki te zwykle zasiedlają przewód pokarmowy (jelita, jama ustna), ale także inne układy, takie jak układ moczowo-płciowy lub oddechowy. Występują u bezkręgowców (pijawki, mięczaki, owady) i kręgowców (ryby, płazy, gady, ptaki, ssaki). Ta grupa jest bardzo zróżnicowana pod względem lokalizacji, a także gatunku gospodarza i patogenności.

Trichomonas tenax jest kosmopolitycznym wiciowcem, zwykle zamieszkującym ludzką jamę ustną, ale także nie specyficznie inne narządy i tkanki; na zewnątrz jamy ustnej pierwotniaka wykryto w węzłach chłonnych, gruczołach podżuchwowych, migdałkach, oskrzelach, płucach, gruczole sutkowym i wątrobie (Duboucher i wsp. 2000, Duboucher i wsp. 1991, Stratakis i wsp. 1999, Mallat i wsp. 2004, Lewis i wsp. 2003, Krvavac 1998, Jakobsen i wsp. 1987). Większość pacjentów z rzadszą lokalizacją zarażenia rzęsistkiem miała obniżoną odporność z powodu chorób przewlekłych oraz przeszczepu. Występowanie *T. tenax* w jamie ustnej opisano u pacjentów z zaburzeniami ogólnoustrojowymi, chorobami genetycznymi, HIV/AIDS, reumatoidalnym zapaleniem stawów i po przeszczepieniu nerki (Chomicz i wsp. 2002, Cielecka i wsp. 2000, Turkowicz i wsp. 2004, Grytner-Zięcina i wsp. 2002, Grzegorczyk-Jaźwińska i wsp. 2001). U tych pacjentów funkcje układu odpornościowego były upośledzone z powodu choroby podstawowej i w wyniku leczenia

sterydami i/lub cytostatykami; ponadto immunosupresja może prowadzić do oportunistycznych chorób pasożytniczych. Długotrwałe stosowanie leków jest często przyczyną zmian w przyzębiu i wpływa na stan błony śluzowej jamy ustnej. Chociaż w niektórych publikacjach rzęsistek *T. tenax* jest nadal uznawany za nieszkodliwego komensala, to jego wysoka aktywność proteolityczna i kolagenolityczna potwierdzona w wielu badaniach wyjaśnia jego patogeniczny wpływ na błonę śluzową jamy ustnej i tkanki (Segovic i wsp. 1998, Bozner i Demes 1991, El Sibaei i wsp. 2012).

Publikacja nr 5 i 6 w cyklu prac dotyczą opracowania i zastosowania metod molekularnych w celu identyfikacji rzęsistków jamy ustnej u różnych grup pacjentów oraz zwierząt domowych.

W **publikacji nr 5** (**Studies on prevalence of infection with *Trichomonas tenax* identified by molecular techniques – in respect to oral health of patients with various systemic disease requiring immunosuppressive therapy**. Dybicz M, Perkowski K, Sędzikowska A, Baltaza W, Chomicz L.) celem badania była ocena występowania *T. tenax* identyfikowanego za pomocą technik molekularnych - w odniesieniu do zdrowia jamy ustnej pacjentów z różnymi chorobami układowymi: cukrzycą, przeszczepem nerki i reumatoidalnym zapaleniem stawów, wymagających terapii immunosupresyjnej.

W celu opracowania metody molekularnej **wykorzystałam sekwencję ITS1 - 5.8S rRNA - ITS2 różnych gatunków rzęsistków zarejestrowanych w banku genów i zaprojektowałam specyficzną parę starterów dla *T. tenax***: T1 (5'-AGAAGTCGTAACAAGGTAACG-3') i T2 (5'-ATGCTTCAGTTCAGCGGGTCT-3') (ARK Scientific Pte Ltd, Maxwell House, Singapur). **Opracowałam również specyficzne warunki PCR w celu amplifikacji tej sekwencji**. Badanie objęło cztery grupy: pacjentów z cukrzycą, przeszczepem nerki, reumatoidalnym zapaleniem stawów i grupę kontrolną, w sumie 498 osób: 261 kobiet i 157 mężczyzn w wieku od 6 do 82 lat. DNA ekstrahowałam od wszystkich pacjentów i zastosowałam jako matrycę w oddzielnych PCR w celu amplifikacji regionu ITS1 - 5,8S rRNA - ITS2. Wielkość produktu specyficzna dla *T. tenax* wynosiła 368 pz. **Częstość występowania *T. tenax* wynosiła 14,6% w grupie kontrolnej, 14,1% u diabetyków, 12,0% u biorców przeszczepu nerki, 14,0% u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów**. Trzynastu pacjentów z cukrzycą z dodatnim wynikiem *T. tenax* było w wieku 32–76 lat; wśród 9 mężczyzn i 4 kobiet większość leczono insuliną, z wyjątkiem jednego mężczyzny otrzymującego Diaprel. U tych pacjentów najczęściej obserwowano zaawansowaną próchnicę, zapalenie przyzębia, zapalenie dziąseł i utratę zębów. Pacjenci po przeszczepieniu

nerki zarażeni *T. tenax* stanowili 4 kobiety i 2 mężczyzn w wieku 41–62 lat; wszyscy byli leczeni preparatem Encorton i cyklosporyną A. Trzech pacjentów otrzymało przeszczep nerki w okresie od 4 tygodni do kilku miesięcy, pozostałych 3 pacjentów - w okresie 3, 5 i 23 lat. W jamie ustnej obserwowano płytkę nazębną, zaawansowane zapalenie dziąseł i niską wartość wskaźnika krwawienia. Siedmiu pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów (5 kobiet i 2 mężczyzn) z rozpoznaniem *T. tenax* było w wieku 53–73 lat i wszyscy otrzymywali Encorton; stan jamy ustnej był stosunkowo dobry przy niskim wskaźniku krwawienia, ale obserwowano również utratę zębów. W grupie kontrolnej u 21 kobiet i 12 mężczyzn w wieku 48–72 lat wykryto *T. tenax*. Różnice w częstości występowania *T. tenax* w różnych grupach nie były bardzo znaczące. Wyniki uzyskane w tych badaniach pokazują, że zarażenie *T. tenax* jest często bezobjawowe, a nie jest typową oportunistyczną chorobą. Ocena porównawcza wyników w tym badaniu wykazała, że **częstość zarażenia *T. tenax* różni się w zależności od wieku człowieka, przy czym częściej występuje u dorosłych**. Wszyscy zarażeni *T. tenax* wykazywali objawy pogorszenia stanu dziąseł i przyzębia, z różną intensywnością w poszczególnych grupach. Poważne choroby układowe u pacjentów poddanych analizie wymagały stałego leczenia, które miało wpływ na stan jamy ustnej. Należy wziąć pod uwagę, że **stałe leki stosowane w leczeniu każdej grupy pacjentów mogą mieć bezpośredni wpływ hamujący na stosunkowo niski odsetek zarażeń *T. tenax*, w związku z czym nie obserwuje się zwiększonego ryzyka rzęsistkowicy jamy ustnej**.

W kolejnej **publikacji nr 6 (Molecular identification of *Trichomonas tenax* in the oral environment of domesticated animals in Poland - potential effects of host diversity for human health.** Dybicz M, Perkowski K, Baltaza W, Padzik M, Sędzikowska A, Chomicz L.) **celem badań była identyfikacja *T. tenax* u zwierząt udomowionych metodami molekularnymi**. Rzęsistki opisywano w jamie ustnej u niektórych naczelnych, psów i kotów; pozostaje jednak niejasne, czy *T. tenax* jest specyficzny tylko dla ludzi. We wcześniejszych badaniach *T. tenax* został wykryty w jamie gębowej psów i kotów metodami molekularnymi (Cielecka i wsp. 2000, Szczepaniak i wsp. 2016, Kellerova i Tachezy 2017). Zmienność morfologiczna i duże podobieństwo między gatunkami występującymi u ludzi i zwierząt, utrudniają specyficzną identyfikację rzęsistków przy pomocy standardowych technik parazytologicznych. Przebadano łącznie 142 psy, 57 kotów i 102 konie. Identycznie jak w publikacji nr 5 badałam region ITS1 - 5.8S rRNA - ITS2, a następnie produkty PCR zostały zsekwencjonowane. Metodą PCR wykryłam *T. tenax* u 7 psów (4,93% zarażonych), 3 kotów (5,26%) i 1 konia (0,98%). W jamie gębowej u 9 zwierząt z 11 rozpoznano zapalenie dziąseł

i nagromadzenie płytki nazębnej. Sekwencje 9 izolatów wykazały 100% identyczność z sekwencją *T. tenax* pochodzącą z banku genów, sekwencje dwóch izolatów różniły się substytucjami. Wszystkie sekwencje zdeponowałam w banku genów pod numerami KP027402, KP120698 – KP120707.

Badanie to wykazało, że *T. tenax* może zasiedlać jamę gębową psa, kota i konia. Mimo że liczba zarażonych kotów i koni była niska - tylko 3 i 1, istotne jest, że *T. tenax* był jedynym gatunkiem zidentyfikowanym u tych zwierząt. U siedmiu psów stwierdzono *T. tenax,* zbadano również właścicieli tych psów i wykryto *T. tenax* u 3 z nich. Zarażenie tym pierwotniakiem odbywa się bezpośrednio poprzez ślinę lub pośrednio poprzez zanieczyszczone naczynia czy ręce. W poprzednich badaniach opisano możliwość łatwego rozprzestrzeniania się *T. tenax* między członkami rodziny (Kurnatowska i wsp. 2004); dlatego nowe dane w prezentowanym badaniu wskazują na ryzyko wzajemnej wymiany rzęsistków między różnymi gatunkami gospodarzy. **Analiza molekularna w tym badaniu wykazała, że *T. tenax,* typowy pierwotniak człowieka, może również zasiedlać jamę gębową psa, kota i konia, dlatego rzęsistkowica ustna rozprzestrzeniana od ludzi na zwierzęta domowe i odwrotnie powinna być brana pod uwagę.**

Podsumowanie publikacji dotyczących badań nad zróżnicowaniem pierwotniaków z rodzaju *Trichomonas* identyfikowanych w jamie ustnej człowieka i zwierząt.

Rzęsistkowica jamy ustnej jest wywoływana przez pierwotniaka ***Trichomans tenax,*** który jest kosmopolitycznym wiciowcem zasiedlającym jamę ustną ludzi ze słabą higieną jamy ustnej i zaawansowanymi chorobami przyzębia. *T. tenax* wykryto również w innych narządach i tkankach, takich jak węzły chłonne, gruczoły podżuchwowe, migdałki, oskrzela, płuca, gruczoł sutkowy i wątroba. Niektóre z tych przypadków dotyczyły osób starszych lub pacjentów ze zmniejszoną odpornością z powodu nowotworu lub alkoholizmu. *T. tenax* jest nadal często uważany za komensala, chociaż wysoka aktywność proteolityczna, a zwłaszcza kolagenolityczna tego wiciowca, tłumaczy jego destrukcyjny wpływ na błony śluzowe i tkanki.

Identyfikacja gatunków rzęsistków metodami konwencjonalnymi (badanie mikroskopowe) napotyka trudności w różnicowaniu gatunku, dlatego też rozwój technik molekularnych umożliwił rozpoznanie gatunku rzęsistka. Amplifikacja genów ITS i 5.8S rRNA metodą PCR, a następnie sekwencjonowanie, są często stosowane do specyficznej charakterystyki rzęsistków.

W prezentowanych publikacjach opracowałam specyficzne dla *T. tenax* startery w celu amplifikacji ITS1 – 5.8S rRNA – ITS2 oraz warunki PCR. Zbadałam różne grupy pacjentów i zwierzęta domowe w celu zweryfikowania gatunku rzęsistka, który zasiedla jamę ustną.

Uzyskane wyniki wykazały obecność ***Trichomonas tenax*** u wszystkich badanych grup żywicieli (publikacja nr 5 i 6). **Częstość występowania *T. tenax* w grupie kontrolnej i badanych grupach pacjentów: diabetyków, biorców przeszczepu nerki, pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów, była podobna**. Pacjenci przyjmowali stałe leki immunosupresyjne, które mogą mieć bezpośredni wpływ hamujący na odsetek zarażeń *T. tenax*. Podsumowując nie zaobserwowano zwiększonego ryzyka rzęsistkowicy jamy ustnej u badanych grup (publikacja 5).

Wykrycie *T. tenax* u psa, kota i konia, wykazało, że pierwotniak ten nie jest specyficzny tylko dla człowieka, a zarażenie między ludźmi i zwierzętami domowymi jest ważnym czynnikiem rozprzestrzeniania się pierwotniaka w środowisku (publikacja 6)**.**

Wszystkie sekwencje ITS i 5.8S rRNA badanych izolatów *T. tenax* zdeponowano w banku genów (GenBank) z numerami: KP027402, KP120698 – KP120707.

Gatunki rzęsistków są morfologicznie podobne, ich różnicowanie jest trudne stosując klasyczne metody parazytologiczne. Podsumowując, dzięki analizie molekularnej można zidentyfikować rzęsistka i jednoznacznie określić jego gatunek u każdego badanego żywiciela.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych habilitanta we wszystkich obszarach wiedzy.

Moje pozostałe osiągnięcia obejmują również zagadnienia wchodzące w zakres metod molekularnych oraz ultrastrukturalnych i mikrobiologicznych w celu identyfikacji patogenów z materiałów klinicznych oraz środowiskowych. Główne obszary badań, w których uczestniczyłam, dotyczą identyfikacji patogenów przenoszonych przez szkodniki żywności *Plodia interpunctella,* ameb wolnożyjących z rodzaju *Acanthamoeba* oraz mikrobiota jamy ustnej. Poniżej pogrupowano osiągnięcia w pozostałych obszarach wiedzy.

5.1. Badania patogenów transmitowanych przez szkodniki żywności *Plodia interpunctella.*

Omacnica spichrzanka *Plodia interpunctella* występuje w różnych przestrzeniach magazynów i sklepów spożywczych; często znajduje się w gospodarstwach domowych. Owady żerują i rozmnażają się na powierzchniach przechowywanych produktów; atakują szeroki zakres suchych produktów spożywczych (Rees 2004, Mohandass i wsp. 2007, Chomicz i wsp. 2011, Chomicz i wsp. 2013, Arthur i wsp. 2013, Chruścikowska i wsp. 2014). Larwy przędą ogromne ilości jedwabiu, które gromadzą zanieczyszczenia: resztki uszkodzonej żywności, odchody owadów, osłonki jaj. Zarażenie magazynowanej żywności przez omacnice powoduje straty w przemyśle spożywczym w różnych regionach świata, również w Polsce. Pomimo faktu, że szkodniki te są ostatnio wykrywane coraz częściej w środowiskach ludzkich, rola form rozwojowych *P. interpunctella* w rozprzestrzenianiu się mikroorganizmów - potencjalnych czynników ryzyka dla zdrowia ludzkiego - jest nadal słabo znana. W ciągu ostatnich kilku lat obserwujemy zwiększoną aktywność omacnic w Polsce. Do tej pory przeprowadzono tylko kilka badań na temat inwazji tym owadem ludzkich gospodarstw domowych w Polsce pod względem ich roli jako źródeł zagrożeń dla zdrowia ludzkiego.

W publikacjach, w których brałam udział dotyczących tych owadów, przeprowadzono badania dotyczące przenoszenia drobnoustrojów oportunistycznych i/lub patogennych przez *P. interpunctella*. Większość publikacji dotyczy badań wykonanych w rozprawie doktorskiej (Agnieszka Chruścikowska, Warszawski Uniwersytet Medyczny), której byłam promotorem pomocniczym. Wyniki badań mikroskopowych, oceny hodowli *in vitro*, badań molekularnych i w skaningowym mikroskopie elektronowym wykazały na *P. interpunctella* obecność bakterii Gram-dodatnich (*Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Staphylococcus epidermidis, Micrococcus luteus, Bacillus cereus*) i Gram-ujemnych (*Klebsiella oxytoca, Escherichia coli*), gatunki drożdżopodobne (*Candida*) i pleśniowe (*Aspergillus*).

Badania wykazują, że najczęstszymi gatunkami wykrywanymi są grzyby z rodzaju *Aspergillus*. Klasyczne metody, takie jak hodowla na podłożu selekcyjnym, nie pozwalają określić gatunku *Aspergillus*, dlatego też podjęłam się opracować metodę molekularną, aby odróżnić gatunki tego grzyba przenoszone przez dorosłe formy i larwy *P. interpunctella*.

Imago, larwy i popłuczyny tych form służyły do ekstrakcji DNA. W celu wykrycia grzybów z rodzaju *Aspergillus* zaprojektowano specyficzne startery dla regionu ITS1 - 5.8S

rRNA - ITS2. Opracowałam warunki PCR do amplifikacji tej sekwencji. Startery produkują amplikony różniące się wielkością charakterystyczną dla różnych gatunków z rodzaju *Aspergillus*. Wykryto *A. flavus, A. fumigatus, A. niger* i *A. terreus*. Badania molekularne oparte na PCR są obecnie często stosowane do charakteryzowania gatunków grzybów (Henry i wsp. 2000, Guan i in. 2007). Wykonana amplifikacja regionu *Aspergillus* ITS1 - 5.8S rRNA - ITS2 umożliwia wykrywanie grzybów; w oparciu o rozmiar produktów PCR możemy wskazać jeden lub kilka gatunków, których rozmiary produktów są zawarte w określonym zakresie wielkości. Jednak sekwencjonowanie produktów PCR jest wymagane dla dokładnej identyfikacji gatunków i szczepów *Aspergillus*. Szczepy *Aspergillus* to gatunki produkujące zarodniki i mikotoksyny, które mogą powodować poważne zagrożenie dla zdrowia ludzi (Bulpa i in. 2007). Konidia grzybów rozproszone przez omacnice w różnych przestrzeniach środowiska ludzkiego mogą być wdychane z powietrza, pyłu i kropelek wody. Formy te są uznawane jako czynniki wywołujące astmę i poważne zakażenia płuc; może również wystąpić niewydolność wątroby, powodująca żółtaczkę. Występowanie szczepów pleśni na lub w dorosłych osobnikach i larwach szkodników sprzyja rozprzestrzenianiu się grzybów w różnych przestrzeniach ludzkich środowisk. Oportunistyczne choroby pleśniowe są poważnym zagrożeniem szczególnie dla osób o obniżonej odporności.

Zawadzki PE, Starościak B, Baltaza W, **Dybicz M,** Pionkowski K, Pawłowski W, Kłyś MA, Chomicz L. The threats for human health induced by food pests of *Plodia interpunctella* as reservoirs of infectious microbiota. Przegl Epidemiol 2016;70(4):617-627.

Współautorstwo w rozdziałach monografii:

Chomicz L, Starościak B, **Dybicz M,** Chruścikowska A, Baltaza W, Pilich I, Perkowski K, Nowakowska J, Zawadzki P**,** Padzik M, Wroczyński P. The role of developmental stages of *Plodia interpunctella* (Arthropoda, Insekta) as reservoirs/vectors of pathogenic fungi distributed in the human environment. In: Arthropods. In the contemporary world. (Ed.: A. Buczek, C. Błaszak), Koliber, Lublin, 2015;327-333.

Chruścikowska A, Starościak B, Asman M, Baltaza W, **Dybicz M**, Perkowski K, Zawadzki P, Piekarczyk P, Biernat B, Chomicz L. Pyralid moths as risk factors for spread of opportunistic/pathogenic microbiota in urban and suburban dwellings. W: Buczek A, Błaszak C.(ed.): Arthropods in the contemporary world. Lubin: Wydawnictwo Koliber, 2015;351-363.

Zawadzki P, Starościak B, **Dybicz M**, Perkowski K., Baltaza W., Kłyś M., Pionkowski K., Jaśniewska E., Chomicz L. Opportunistic strains - risk factors of infections in humans - detected in synanthropic arthropods occurring inside and in vicinity of health facilities. In: Buczek A., Błaszak C. (eds.), Arthropods. Interrelationships in the host-ectoparasite-pathogen system. Koliber, Lublin, 2016;89-96.

Baltaza W, **Dybicz M**, Perkowski K, Padzik M, Kłyś M, Malejky N, Żerańska M, Wieliczko M, Chomicz L. Awareness of human health threats caused by food pests *Plodia interpunctella* (Arthropoda, Insecta) among high school and medical school students. [W:] Stawonogi na początku nowego wieku; pod red. A. Buczek, C. Błaszaka. Lublin: Wydawnictwo Koliber, 2018;233-240.

5.2. Badania zagrożeń zdrowia publicznego indukowanych przez ameby amfizoiczne.

Ameby należące do rodzaju *Acanthamoeba* są rozpowszechnione w środowiskach naturalnych i stworzonych przez człowieka na całym świecie. Są to organizmy wolno żyjące, występujące jako wegetatywne trofozoity tworzące cysty w trudnych warunkach. Pierwotniaki te występują w morzu, wodzie kranowej, basenach, systemach klimatyzacji i nawilżaczach; występują również w kurzu i glebie, na owocach i warzywach oraz w ciałach zwierząt. Zostały one wykryte w środowisku szpitalnym jako zanieczyszczenia narzędzi chirurgicznych i dentystycznych, a także w różnych tkankach ludzkich oraz na powierzchni skóry, w jamie ustnej, zatokach przynosowych, płucach i mózgu (Teknos i wsp. 2003, Lorenzo-Morales i wsp. 2015).

W wielu krajach, w tym w Polsce, wśród użytkowników szkieł kontaktowych wzrasta częstość grożących ślepotą zarażeń rogówki *Acanthamoeba* keratitis, trudnych terapeutycznie z powodu oporności cyst ameb i często błędnej diagnozy. Klasyfikacja oparta na morfologii cyst okazała się niewystarczająca dla różnicowania izolatów. Najnowsze badania oparte na sekwencji rybosomalnego RNA wykazały dużą różnorodność genetyczną ameb amfizoicznych (Schroeder i wsp. 2001, Khan i wsp. 2002, Booton i wsp. 2009, Risler i wsp. 2013, Walochnik i wsp. 2015).

W zaprezentowanych badaniach, których efektem było kilka publikacji, analizowano na poziomie klinicznym, morfologicznym i molekularnym ciężkie przypadki zapalenia rogówki

spowodowanego przez *Acanthamoeba* w Polsce. Ocena molekularna wykazała, że wszystkie sekwencje patogennych izolatów miały 98–100% homologię z genotypem T4 *Acanthamoeba*, najczęstszym genotypem w przypadku ludzkich zarażeń oka na całym świecie. Testy *in vitro* wykazały, że szczepy patogenne są zdolne do rozmnażania w podwyższonej temperaturze i mają duże zdolności adaptacyjne. Przetestowano wybrane środki dezynfekcyjne stosowane w placówkach opieki zdrowotnej i laboratoriach, a ich skuteczność oceniono na szczepach rogówkowych *A. castellanii* i *A. polyphaga* oraz na środowiskowym szczepie *A. castellanii* Neff. Wyniki pokazały efekty amebostatyczne środków dezynfekujących. Porównawcze badania antyseptycznego diglukonianu chloroheksydyny wykazały *in vitro* działanie anty-amebowe na środowiskowy szczep *A. castellanii* Neff i genotyp rogówki *A. polyphaga* T4. Działanie amebostatyczne widoczne było w zredukowanej liczbie ameb w porównaniu z kulturą kontrolną. Szczep rogówkowy *Acanthamoeba* był bardziej oporny na badany związek niż szczep Neff. Badanie wpływu zmiany temperatury na dynamikę populacji różnych szczepów ameb wykazało zmiany gęstości populacji i tolerancję temperatury korelującą z patogennością ameb. Zdolność tych ameb do rozwoju w wyższych temperaturach jest skorelowana z patogennością izolatów rogówkowych *Acanthamoeba*. Termotolerancja uważana jest za pośredni wskaźnik patogeniczności ameb.

Chomicz L, Conn DB, Padzik M, Szaflik JP, Walochnik J, Zawadzki PJ, Pawłowski W, **Dybicz M**. Emerging threats for human health in poland: Pathogenic isolates from drug resistant *Acanthamoeba* keratitis monitored in terms of their in vitro dynamics and temperature adaptability. BioMed Research International 2015; 2015, Article ID 231285.

Baltaza W, Padzik M, Szaflik JP, **Dybicz M**, Hendiger E, Chomicz L. Amoebicidal or amoebostatic influence of disinfectants used in health facilities and laboratories on corneal strains of *Acanthamoeba*. Ann Parasitol 2017;63(3):175-180.

Padzik M. Szaflik J.P., Baltaza W., Perkowski K., **Dybicz M**., Chomicz L. *In vivo* confocal microscopy and *in vitro* culture techniques as tools for evaluation of severe *Acanthamoeba* keratitis incidents. Ann Parasitol 2017;63(4):341-346.

Padzik M, Baltaza W, Szaflik JP, Hendiger E, **Dybicz M**, Chomicz L. Comparison of chlorhexidine disinfectant *in vitro* effect on environmental and ocular *Acanthamoeba* strains,

the amoebic agents of human keratitis − an emerging sight-threatening corneal disease in Poland. Ann Parasitol 2018;64(3):229-233.

Baltaza W, Padzik M, Szaflik JP, **Dybicz M**, Grochowska A, Kuryłowicz A, Chomicz L. Comparative examination on selected amphizoic amoebae in terms of their *in vitro* temperature tolerance - a possible indirect marker of potential pathogenicity of *Acanthamoeba* strains. Ann Parasitol 2018;64(4):317-322.

Baltaza W, Padzik M, Szaflik JP, Perkowski K, **Dybicz M**, Chomicz L. Evaluation of in vitro effects of selected physical and chemical agents on detected in Poland *Acanthamoeba* strains – factors of increasing threats for public health. Ann Parasitol 2019;65(1):19-25.

Współautorstwo w rozdziale monografii:
Pawłowski W., Baltaza W., Starościak B., Padzik M., Zawadzki P., Pilich I., **Dybicz M**., Domańska B., Chomicz L. Effects of Amphizoic Amoeba Spread in Human Environments – Emerging Threat for Public Health in Poland. In: Romaniuk P., Grochowska-Niedworok E. (ed.): Health for Public, Public for Health. Heath systems in V4 countries. Lublin: Wyd. Fundacja na rzecz promocji nauki i rozwoju TYGIEL, 2016; 232-240.

5.3. Badania nicieni na modelu eksperymentalnym myszy.

Trichinella spiralis i *Toxocara canis* są nicieniami ważnymi medycznie. *T. spiralis* (włosień kręty) jest jednym z najgroźniejszych pasożytów człowieka – wywołuje włośnicę (trychinozę), która może mieć ciężki przebieg, kończący się niekiedy śmiercią. *T. canis* (glista psia) typowo pasożytuje w jelicie cienkim psa. Człowiek może stać się żywicielem przypadkowym glisty psiej, której larwy lokalizują się w obrębie wątroby, śledziony, oka.

Badania obu gatunków nicieni dotyczyły zarażeń eksperymentalnych myszy. Podczas migracji przez płuca larwy *T. spiralis* i *T. canis* indukują wiele zmian w miąższu płuc. Za pomocą mikroskopii elektronowej zidentyfikowaliśmy i opisaliśmy zmiany histopatologiczne. Zmiany te wynikały z uszkodzeń mechanicznych lub lokalnych reakcji zapalnych wywołanych przez larwy. Badania ultrastrukturalne wykazały, że larwy *T. spiralis* migrujące przez płuca wywoływały głównie zniszczenie komórek nabłonkowych

typu I, zniszczenie ciałek blaszkowatych komórek nabłonkowych lub zewnątrzkomórkowej warstwy wyściółki pęcherzykowej. W przeciwieństwie do tego, zarażenie larwami *T. canis* zainicjowało głównie eozynofilowe zapalenie okołonaczyniowe i zapalenie naczyń, jak również nagromadzenie makrofagów w płucach, na które dodatkowo wpłynęły liczne krystaloidy w makrofagach. Podsumowując, larwy *T. spiralis* i larwy *T. canis* indukowały różne zmiany patologiczne w płucach zakażonych myszy.

Dabrowska J, Walski M, **Dybicz M**, Doligalska M. Comparative ultrastructural studies of the alterations to mouse lung parenchyma during *Trichinella spiralis* or *Toxocara canis* infection. Parasite Immunol 2012;34(10):455-643.

5.4. Badania microbiota jamy ustnej u pacjentów z zaburzeniami układu żucia.

Najczęstszymi wadami wrodzonymi w jamie ustnej są zaburzenia stomatologiczne, rozszczep wargi i podniebienia. Zapadalność waha się od 1/500 do 1/2500 żywych urodzeń. Leczenie pacjentów z wadami rozwojowymi jest długotrwałe i obejmuje leczenie ortodontyczne. Zarówno wady rozwojowe, jak i stosowanie aparatów ortodontycznych znacząco zmieniają stan jamy ustnej pacjentów. Takie zmiany mają wpływ na mikrobiota jamy ustnej, zmieniając skład mikroorganizmów fizjologicznych i wywołując pojawienie się oportunistycznych i potencjalnie patogennych bakterii, grzybów, protista. Koinfekcje różnymi szczepami oportunistycznymi/patogennymi są potencjalnie poważnymi czynnikami ryzyka lokalnych i ogólnych powikłań u pacjentów z różnymi wrodzonymi wadami rozwojowymi. Badaniem objęto pacjentów w różnym wieku, z wrodzoną wadą wrodzoną lub bez niej, przed leczeniem ocenianym pod kątem występowania zmian patologicznych w układzie żucia. Próbki wymazów wykorzystano do identyfikacji pierwotniaków w preparatach bezpośrednich i barwionych; dodatkowo przeprowadzono badanie przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Materiał wykorzystano do hodowli *in vitro* w celu identyfikacji szczepów bakterii. Żywe trofozoity *Trichomonas tenax* i *Entamoeba gingivalis* wykryto z większą częstością u starszych pacjentów. Gatunki należące do *Staphylococcus aureus* i *Enterobacteriaceae* były częściej wykrywane u pacjentów z opóźnieniem umysłowym. U tych pacjentów wystąpiły również oportunistyczne *Klebsiella pneumonia* i *Pseudomonas aeruginosa*. Nieprawidłowości układu żucia sprzyjają kolonizacji jamy ustnej przez gatunki

egzogenne i rozprzestrzenianiu się zakażeń, szczególnie niebezpiecznych dla pacjentów z chorobami wrodzonymi.

Perkowski K, Zawadzki P, Starościak B, **Dybicz M,** Padzik M, Marczyńska-Stolarek M, Chomicz L. Składniki mikrobiomu jamy ustnej jako czynniki ryzyka zakażeń lokalnych i uogólnionych u pacjentów bez oraz z wadami wrodzonymi narządu żucia. Postępy Mikrobiologii 2016;55(1):57-67.

Zawadzki PJ, Perkowski K, Starościak B, **Dybicz M**, Baltaza W, Pionkowski K, Chomicz L. Evaluation of selected oral cavity microbiota--risk factors of management complications in patients with masticatory system disorders. Ann Parasitol 2016;62(1):71-76.

5.5. Badania stawonogów z rodzaju *Demodex*.

Współautorstwo w rozdziale monografii:
Przydatek-Tyrajska R, Bartosik K, Sędzikowska A, **Dybicz M**, Buczek W, Buczek A. *Demodex* infestation in aesthetic medicine patients - preliminary study. [W:] Stawonogi na początku nowego wieku; pod red. A. Buczek, C. Błaszaka. Lublin: Wydawnictwo Koliber, 2018;169-178.

5.6. Pozostałe osiągnięcia związane z działalnością popularyzatorską i dydaktyczną.

Wynikiem mojej aktywności związanej z szerzeniem wiedzy na temat chorób pasożytniczych jest również współautorstwo w podręcznikach i monografiach.

Rozdział w podręczniku dedykowanym dla studentów medycyny w języku angielskim:
- Bartosik K, Buczek A, Cielecka D, Cisowska A, Grytner-Zięcina B, Kiziewicz B, Kosieliński P, Kuźna-Grygiel W, Myjak P, Olszewski T, Olszewski K, Piasecki W, Pokora Z, Solarz K, Stańczak J, **Turkowicz M**, Wojnicz D. Parasitology for medical students. Lublin. KOLIBER, 2006. ISBN 83-60497-30-3. The Cestodes, 152-182.

Opracowania w języku angielskim:

- **Dybicz M**, Dąbrowska J. Biology: materials for English Dentistry Division. Warszawa: Oficyna Wydawnicza Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, 2013. 59 s.
- Dąbrowska J, **Dybicz M**, Luto-Lach K, Młocicki D, Pliszka M, Sędzikowska A, Sobczyk-Kopcioł A, Supergan-Marwicz M, Twarowska-Małczyńska J. Biology workbook for premed college students. Warszawa: Oficyna Wydawnicza Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, 2016. 188 s.

Opracowania w języku polskim:

- **Dybicz M**. Materiały do ćwiczeń z biologii dla studentów I roku oddziału stomatologii. Warszawa: Oficyna Wydawnicza Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, 2008. 62 s.
- **Dybicz M**, Dąbrowska J. Biologia: materiały do ćwiczeń z biologii dla studentów I roku Wydziału Lekarsko-Dentystycznego. Warszawa: Oficyna Wydawnicza Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, 2012. 55 s.
- Dąbrowska J, **Dybicz M**, Oleszczak B, Pliszka M, Sędzikowska A, Sobczyk-Kopcioł A, Supergan-Marwicz M, Twarowska-Małczyńska J. Podstawy biologii molekularnej: materiały do ćwiczeń dla studentów I roku I i II Wydziału Lekarskiego. Wyd. 2. popr. Warszawa, Oficyna Wydawnicza Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego 2014, 76 s.

Pozostałe aktywności związane z moją działalnością przedstawiłam w załączniku 4.

Mój dorobek składa się z publikacji oryginalnych, prac poglądowych, rozdziałów w monografiach - 23 prace o łącznej wartości bibliometrycznej 312 pkt. MNiSW, w tym 7 publikacji naukowych z IF 14.831, 165 pkt. MNiSW, 9 bez IF, 132 pkt. MNiSW, 1 pracy poglądowej z IF 0,311, 15 pkt. MNiSW, 7 rozdziałów w monografiach krajowych i międzynarodowych.

Wartość bibliometryczna prac, w których jestem pierwszym autorem: 120 pkt. MNiSW, w tym IF 7.944 (90 pkt. MNiSW), bez IF - 30 pkt. MNiSW.

Osiągniecie naukowe zgłoszone do postępowania habilitacyjnego stanowi cykl prac, składający się z 7 publikacji oryginalnych, których łączna wartość to 150 pkt. MNiSW, w tym IF 10.489 (120 pkt. MNiSW).

Przed doktoratem IF = 0.433, 21 pkt. MNiSW, po doktoracie IF = 15.142, 312 pkt. MNiSW. Liczba cytowań z bazy Web of Science z dn. 10.04.2019 (bez autocytowań) = 37. Indeks Hirsha z bazy Web of Science z dn. 10.04.2019 = 4.

6. Piśmiennictwo.

1. Arthur FH, Campbell JF, Toews MD. Distribution, abundance, and seasonal patterns of *Plodia interpunctella* (Hübner) in a commercial food storage facility. Journal of Stored Products Research 2013; 43:7-14.
2. Avila HG, Santos GB, Cucher MA, Macchiaroli N, Pérez MG, Baldi G, Jensen O, Pérez V, López R, Negro P, Scialfa E, Zaha A, Ferreira HB, Rosenzvit M, Kamenetzky L. Implementation of new tools in molecular epidemiology studies of *Echinococcus granulosus* sensu lato in South America. Parasitology International 2017; 66(3):250–257.
3. Booton GC, Joslin CE, Shoff M, Tu EY, Kelly DJ, Fuerst PA. Genotypic identification of *Acanthamoeba* sp. isolates associated with an outbreak of *Acanthamoeba* keratitis. Cornea 2009; 28(6):673–676.
4. Bowles J, Blair D, McManus DP. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. Molecular and Biochemical Parasitology 1992; 54:165–174.
5. Bowles J, McManus DP. NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. International Journal of Parasitology 1993; 23:969–972.
6. Bozner P, Demes P. Degradation of collagen types I, III, IV and V by extracellular proteinases of an oral flagellate *Trichomonas tenax*. Archives of Oral Biology 1991; 36:765–770.
7. Bulpa P, Dive A, Sibille Y. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease. European Respiratory Journal 2007; 30:782–800.
8. Chomicz L, Chruścikowska A, Starościak B, Padzik M, Olędzka G, Baltaza W, Olczak M. *Plodia interpunctella* (Arthropoda:Insecta) as a risk factor for spread of opportunistic/ pathogenic microorganisms in different areas of human environment. In: Buczek A., Błaszak C. (eds.), Arthropods. The medical and veterinary aspects, Koliber, Lublin, 2013; 85–92.
9. Chomicz L, Piekarczyk J, Starościak B, Fiedor P, Piekarczyk B, Szubińska D, Zawadzki PJ, Walski M. Comparative studies on the occurrence of protozoans, bacteria and fungi in the oral cavity of patients with systemic disorders. Acta Parasitologica 2002; 47(2):147–153.

10. Chomicz L, Starościak B, Chruścikowska A, Kryczka T, Iwańczyk B, Olędzka G. Microorganisms transmitted by pests from genus *Plodia* (Insecta: Lepidoptera, Pyralidae) as a risk for human health. In: Buczek A., Błaszak C. (eds.), Arthropods. Human and animal parasites. Akapit, Lublin, 2011; 157–165.
11. Chruścikowska A, Chomicz L, Starościak B, Padzik M, Asman M, Baltaza W, Olczak M. The infestation of selected household areas in Poland with pyralid pests, health risk factors as reservoirs/vectors for human pathogens. n: Buczek A., Błaszak C. (eds.), Arthropods. Threat to human and animal health, Koliber, Lublin, 2014; 359–368.
12. Cielecka D, Borsuk P, Grytner-Zięcina B, Turkowicz M. First detection of *Trichomonas tenax* in oral cavity of dog and cat by PCR-RFLP. Acta Parasitologica 2000; 45:350–352.
13. Cielecka D, Chomicz L, Piekarczyk J, Walski M, Zawadzki PJ, Bednarczyk A, Szubińska D. Oral cavity condition and occurrence of parasitic protozoans in patients with genetic diseases. Acta Parasitologica 2000; 45(2):107–112.
14. de la Rue ML, Takano K, Brochado JF, Costa CV, Soares AG, Yamano K, Yagi K, Katoh Y, Takahashi K. Infection of humans and animals with *Echinococcus granulosus* (G1 and G3 strains) and *E. ortleppi* in Southern Brazil. Veterinary Parasitology 2011; 177(1-2):97–103.
15. Duboucher C, Farto-Bensasson F, Chéron M, Peltier JY, Beaufils F, Périé G. Lymph node infection by *Trichomonas tenax*: report of a case with co-infection by Mycobacterium tuberculosis. Human Pathology 2000; 31:1317–1321.
16. Duboucher C, Mogenet M, Périé G. Salivary trichomoniasis. A case report of infestation of a submaxillary gland by *Trichomonas tenax*. Archives of Pathology & Laboratory Medicine 1991; 119:277–279.
17. El Sibaei MM, Abdel-Fattah NS, Ahmed SA, Abou-Seri HM. Growth kinetics, antigen profiling, and proteinase activity of Egyptian *Trichomonas tenax* isolates derived from patients having oral infections. Experimental Parasitology 2012; 130:416–422.
18. Grenouillet F, Umhang G, Arbez-Gindre F, Mantion G, Delabrousse E, Millon F, Boué F. *Echinococcus ortleppi* infections in humans and cattle, France. Emerging Infectious Diseases 2014; 20(12):2100–2102.
19. Grytner-Zięcina B, Jaworski J, Cielecka D, Gierczak A, Turkowicz M. Występowanie rzęsistka policzkowego *Trichomonas tenax* w jamie ustnej pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów. Reumatologia 2002; 3:141–145.

20. Grzegorczyk-Jaźwińska A, Cielecka D, Juskowa J, Borakowska-Siennicka M, Gierczak A, Ołdakowska-Jedynak U., Turkowicz M. Występowanie *Trichomonas tenax* i stan jamy ustnej u pacjentów po przeszczepieniu nerki. Nowa Stomatologia 2001; 4: 43-45.
21. Guan H, Yang L, Guo J, Ma X, Wang H, You S. Morphological and molecular identification of *Aspergillus versicolor* D−1 with selective reduction ability. Asian Journal of Traditional Medicines 2007; 2:39–44.
22. Henry T, Iwen PC, Hinrichs SH. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. Journal of Clinical Microbiology 2000; 38:1510–1515.
23. Jakobsen EB, Friis-Møller A, Friis J. *Trichomonas* species in a subhepatic abscess. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 1987; 6:296–297.
24. Jenkins D, Romig T, Thompson R. Emergence/re-emergence of *Echinococcus* spp. - a global update. International Journal for Parasitology 2005; 35(11-12):1205–1219.
25. Karamon J, Kochanowski M, Sroka J, Cencek T, Rozycki M, Chmurzynska E, Bilska-Zajac E. The prevalence of *Echinococcus multilocularis* in red foxes in Poland – current results (2009–2013). Parasitology Research 2014; 113:317–322.
26. Kędra AH, Świderski Z, Tkach VV, Dubinski P, Pawłowski Z, Stefaniak J, Pawlowski J, Genetic analysis of *Echinococcus granulosus* from humans and pigs in Poland, Slovakia and Ukraine. Acta Parasitologica 1999; 44(4):248–254.
27. Kellerova P, Tachezy J. Zoonotic *Trichomonas tenax* and a new trichomonad species, *Trichomonas brixi* n. sp., from the oral cavities of dogs and cats. International Journal of Parasitology 2017; 47:247–255.
28. Khan NA, Jarroll EL, Paget TA. Molecular and physiological differentiation between pathogenic and non-pathogenic *Acanthamoeba*. Current Microbiology 2002; 45(3):197–202.
29. Kozłowska-Łój J, Bartosik K, Łój-Maczulska A. Prevalence of hydatidosis in pigs in the Lublin province (Poland) in the years 2005–2008. Annals of Parasitology 2011; 57:281–283.
30. Krvavac S. Trichomoniasis of the breast diseased by fibrocystic mastopathy: pathogenic rather than saprophytic relationship [*Trichomonas* in fibrocystic mastopathy process]. Medical Archives 1998; 52:143–145.
31. Kurnatowska AJ, Dudko A, Turkowicz M. Familial infections with *Trichomonas tenax* [O.F. Müller, 1773], Dobel, 1939. Wiadomości Parazytologiczne 2004; 50:35–40.

32. Lewis KL, Doherty DE, Ribes J, Seabolt JP, Bensadoun ES. Empyema caused by *Trichomonas*. Chest 2003; 123:291–292.
33. Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. Parasite 2015; 22(10):1–20.
34. Malczewski A, Gawor J, Malczewska M. Infection of red fox (*Vulpes vulpes*) with *Echinococcus multilocularis* during the years 2001–2004 in Poland. Parasitology Research 2008; 103:501–505.
35. Mallat H, Podglajen I, Lavarde V, Mainardi JL, Frappier J, Cornet M. Molecular characterization of *Trichomonas tenax* causing pulmonary infection. Journal of Clinical Microbiology 2004; 42:3886–3887.
36. McManus DP, Zhang W, Li J, Bartley PB. Echinococcosis. The Lancet 2003; 362(9392):1295–1304.
37. Mogoye BK, Menezes CN, Wong ML, Stacey S, von Delft D, Wahlers K, Wassermann M, Romig T, Kern P, Grobusch MP, Frean J. First insights into species and genotypes of *Echinococcus* in South Africa. Veterinary Parasitology 2013;196(3-4):427–432.
38. Mohandass S, Arthur FH, Zhu KY, Throne JE. Biology and management of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) in stored products. Journal of Stored Products Research 2007; 43:302–311.
39. Nahorski W, Knap JP, Pawłowski ZS, Krawczyk M, Polański J, Stefaniak J, Patkowski M, Szostakowska B, Pietkiewicz H, Grzeszczuk A, Felczak-Korzybska I, Gołąb E, Wnukowska N, Paul M, Kacprzak E, Sokolewicz-Bobrowska E, Niścigorska-Olsen J, Czyrznikowska A, Chomicz L, Cielecka D, Myjak P. Human alveolar echinococcosis in Poland: 1990–2011. PLoS Neglected Tropical Diseases 2013; 7:1986–1994.
40. Nakao M, McManus D, Schantz P, Craig P, Ito A. Amolecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. Parasitology 2006; 134(5):713–722.
41. Ołdakowska-Jedynak U, Turkowicz M. Występowanie *Trichomonas tenax* i stan jamy ustnej u pacjentów po przeszczepieniu nerki. Nowa Stomatologia 2001; 4:43–45.
42. Pawlowski Z, Eckert J, Vuitton DA, Ammann RW, Kern P, Craig PS. Echinococcosis in humans: clinical aspects, diagnosis and treatment. In: Eckert J, Gemmell MA, Meslin FX, Pawlowski Z, editors. WHO/OIE Manual on Echinococcosis in humans and animals. Paris: Office International des Epizooties; 2001; 20–71.
43. Rees D. Insects of stored products. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia, 2004.

44. Risler A, Coupat-Goutaland B, Pelandakis M. Genotyping and phylogenetic analysis of *Acanthamoeba* isolates associated with keratitis. Parasitology Research 2013; 112(11):3807–3816.
45. Romig T, Dinkel A, Mackenstedt U. The present situation of echinococcosis in Europe. Parasitology International 2006; 55:187–191.
46. Schroeder JM, Booton GC, Hay J. Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. Journal of Clinical Microbiology 2001; 39(5):1903–1911.
47. Segovic S, Buntak-Kobler D, Galic N, Katunaric M. *Trichomonas tenax* proteolytic activity. Collegium Antropologicum 1998; 22:45–49.
48. Sharma M, Sehgal R, Fomda BA, Malhotra A, Malla N. Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* cysts in North Indian patients: Identification of G1, G3, G5 and G6 genotypes. PLOS Neglected Tropical Diseases 2013; 7(6).
49. Stratakis DF, Lang SM, Eichenlaub S, Löscher T, Stein R, Huber RM. Pulmonary trichomoniasis: diagnosis based on identification of irritation in bronchoalveolar lavage. Pneumologie. 1999; 53:617–619.
50. Szczepaniak K, Łojszczyk-Szczepaniak A, Tomczuk K, Skrzypek T, Lisiak B, Abd-*Al*-Hammza Abbass Z. Canine *Trichomonas tenax* mandibular gland infestation. Acta Veterinaria Scandinavica 2016; 58:15.
51. Teknos TN, Poulin MD, Laruentano AM, Li KK. *Acanthamoeba* rhinosinusitis: characterization, diagnosis, and treatment. American Journal of Rhinology 2000;14(6):387–391.
52. Thompson RCA. The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. Experimental Parasitology 2008; 119(4):439-446.
53. Turkowicz M, Tomaszewska D, Cielecka D. Molecular diagnosis of oral cavity trichomonads in HIV patients. Wiadomości Parazytologiczne 2004; 47:181–186.
54. Van De N, Le Van D. The first report of two cases of cystic echinococcosis in the lung by *Echinococcus ortleppi* infection, in Vietnam. Research and Reports in Tropical Medicine 2017; 8:45–51.
55. Walochnik J, Scheikl U, Haller-Schober EM. Twenty years of *Acanthamoeba* diagnostics in Austria. Journal of Eukaryotic Microbiology 2015; 62(1):3–11.

Monika Rybka