

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny
Zakład Parazytologii
Chocimska 24
00-791 Warszawa

Autoreferat
dr n. biol. Aleksander Masny
Warszawa 2017

1. **Imię i Nazwisko: Aleksander Masny**

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

2004 Doktor nauk biologicznych w dziedzinie biochemii *Opracowanie dwóch nowych metod typowania DNA* Instytut Biochemii i Biofizyki, Warszawa, Polska

2000 Magister biologii, kierunek biotechnologia, Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, kierunek Biotechnologia. Warszawa, Polska

3. **Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.**

2008-obecnie Adiunkt *Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny*, Warszawa, Polska

2005-2007 Postdoctoral Fellow, *Boston University, Biomedical Engineering Department* – Massachusetts, USA

2004-2005 Postdoctoral Fellow, *Medical University of South Carolina, Biochemistry Department*, South Carolina, USA

2000-2004 Asystent, *Instytut Biotechnologii i Antybiotyków, Zakład Bioinżynierii* – Warszawa, Polska

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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.)**

4.a. **Tytuł osiągnięcia naukowego:**

ZASTOSOWANIE ORAZ ZALETY I OGRANICZENIA ŁAŃCUCHOWEJ REAKCJI POLIMERAZY (PCR) W DIAGNOSTYCE PARAZYTOZ ORAZ MONITORINGU OBECNOŚCI PASOŻYTÓW W OTOCZENIU CZŁOWIEKA.

4.b. **Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe (od najnowszych):**

1. **Masny A**, Sałamatin R, Rozej-Bielicka W, Golab E. *Is molecular xenomonitoring of mosquitoes for *Dirofilaria repens* suitable for dirofilariosis surveillance in endemic regions?* Parasitol Res. Online 2015 Oct 22. 2016, 115:(2);511-525 **IF 2,027 MNiSW 30**
2. **Masny A**, Sałamatin R. *Molecular mass screening of mosquitoes for filarial parasites in Germany--re-interpretation of PCR xenomonitoring results would be required.* Parasit Vectors. 2015, 8:626. doi: 10.1186/s13071-015-1241-3. **IF 3,234 MNiSW 35**
3. Sałamatin RV, Pavlikovska TM, Sagach OS, Nikolayenko SM, Korniyushin VV, Kharchenko VO, **Masny A**, Cielecka D, Konieczna-Sałamatin J, Conn DB, Golab E. *Human dirofilariasis due to *Dirofilaria repens* in Ukraine, an emergent zoonosis: epidemiological report of 1465 cases.* **Acta Parasitol.** **2013**, 58(4):592-8. doi: 10.2478/s11686-013-0187-x. **IF 0,965 MNiSW 15**
4. **Masny A**, Jagiełło A, Płucienniczak G, Golab E. *Ribo HRM--detection of inter- and intra-species polymorphisms within ribosomal DNA by high resolution melting analysis supported by application of artificial allelic standards.* J Microbiol Methods. 2012, 90(3):336-41. doi: 10.1016/j.mimet.2012.06.012. **IF 2,161 MNiSW 25**
5. Cielecka D, Żarnowska-Prymek H, **Masny A**, Sałamatin R, Wesołowska M, Gołab E. *Human dirofilariosis in Poland: the first cases of autochthonous infections with *Dirofilaria repens*.* **Ann Agric Environ Med.** **2012**, 19(3):445-50. **IF 3,060 MNiSW 25**
6. **Masny A**, Lewin T, Sałamatin R, Golab E. *Autochthonous canine *Dirofilaria repens* in the vicinity of Warsaw.* Pol J Vet Sci. 2011, 14(4):659-61. **IF 0,565 MNiSW 20**
7. **Masny A**, Lewin T, Sałamatin R, Golab E. *The first report on detection of canine *Acantocheilonema reconditum* in Poland and the associated diagnostic problems.* Pol J Vet Sci. 2011,14(3):485-7. **IF 0,565 MNiSW 20**
8. **Masny A**, Żarnowska-Prymek H, Cielecka D, Sałamatin R, Gołab E. [*Procedures for species identification of the nematodes belonging to *Dirofilaria* genus present in the clinical material isolated from humans*]. Med Dosw Mikrobiol. 2010, 62(2):181-8. Polish. **MNiSW 9**
9. Golab E, Rozej W, Wnukowska N, Rabczenko D, **Masny A**. *Detection of *Trichinella spiralis* DNA in mouse faeces during the early stage of infection.* J Microbiol Methods. 2009, 78(2):213-5. **IF 2,427 MNiSW 27**
10. **Masny A**, Rozej W, Gołab E. [*Development of efficient DNA isolation procedures for *Cryptosporidium* and *Trichinella* PCR detection in fecal samples*]. Med Dosw Mikrobiol. 2009, 61(3):259-65. Polish. **MNiSW 9**

Podstawowe informacje bibliometryczne o publikacjach stanowiących osiągnięcie naukowe:

Łączny Impact Factor prac wchodzących w zakres osiągnięcia wynosi **15,004**

Łączny punktów MNiSW prac wchodzących w zakres osiągnięcia wynosi 215
w tym jako **autor: pierwszy i korespondencyjny (IF=7,745 oraz MNiSW=148)** i jedna praca jako autor ostatni i korespondencyjny (IF=2,427 oraz MNiSW 27) **łącznie jako pierwszy i ostatni autor korespondencyjny: IF=10,176 oraz MNiSW 175**

Indeks Hirsh'a: 9

4.c. Omówienie celu naukowego ww. pracy i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich wykorzystania.

Celem osiągnięcia naukowego była krytyczna ocena możliwych zastosowań łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) w diagnostyce, monitoringu i epidemiologii chorób pasożytniczych.

Wprowadzenie

W diagnostyce chorób pasożytniczych coraz częściej stosuje się metodę łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR), jako uzupełnienie lub w zastępstwie metod mikroskopowych i diagnostyki serologicznej. Wybór PCR jako narzędzia w badaniach diagnostycznych następuje ze względu na wysoką czułość i specyficzność tej metody. Jednak oba wyżej wymienione parametry są zachowane tylko pod określonymi warunkami i z tego względu w cyklu prac podkreślano znaczenie przeprowadzenia zrównoważonej oceny zalet i ograniczeń PCR jako narzędzia stosowanego w diagnostyce chorób pasożytniczych.

Pasożyty są grupą filogenetycznie niejednorodną składającą się z organizmów eukariotycznych, od jednokomórkowych po wielokomórkowe, niejednokrotnie posiadające sekwencje DNA podobne do sekwencji obecnych w genomie żywiciela. Ostatnia z wymienionych cech pasożytów zwiększa ryzyko wystąpienia reakcji niespecyficznych w testach PCR. Fragmentaryczna wiedza o genomach wielu pasożytów może utrudniać przewidywanie specyficzności nowo projektowanych testów diagnostycznych. Jednak niskie zróżnicowanie morfologiczne pasożytów zarówno jednokomórkowych takich jak *Cryptosporidium* czy wielokomórkowych takich jak nicienie *Trichinella* sprawia, że często najbardziej wiarygodnym sposobem identyfikacji gatunku są badania molekularne.

W pracach stanowiących cykl skupiono się na analizie czynników mających znaczenie w doborze odpowiednich technik do prowadzenia badań diagnostycznych i środowiskowych. Z tego względu położono nacisk na wykazanie związku pomiędzy właściwościami użytych metod a wiarygodnością uzyskanych wyników i wynikających z nich wniosków. Szczególną uwagę poświęcono diagnostyce i monitoringowi pasożytów, które pojawiły się w naszym kraju na przełomie XX i XXI wieku.

W założeniu cykl prac miał za zadanie badania nad użytecznością PCR w parazytologii i analizę wykorzystania metod molekularnych w diagnostyce, monitoringu zarażeń i badaniach epidemiologicznych.

Listę prac tworzących cykl uporządkowano chronologicznie, od najnowszych do najstarszych i nadano im numery od 1. do 10. W opisie cyklu prac przedstawiono wnioski wynikające z poszczególnych prac oraz sformułowane na podstawie całego cyklu. Ponieważ spektrum badanych pasożytów i poruszanych zagadnień jest stosunkowo szerokie w poszczególnych częściach autoreferatu umieszczono krótkie wprowadzenia do kolejnych, omawianych zagadnień.

ZASTOSOWANIE, ZALETY I OGRANICZENIA ŁAŃCUCHOWEJ REAKCJI POLIMERAZY (PCR) W DIAGNOSTYCE PARAZYTOZ ORAZ MONITORINGU OBECNOŚCI PASOŻYTÓW W OTOCZENIU CZŁOWIEKA

Wpływ użytego materiału biologicznego i metody izolacji DNA, na wyniki testów diagnostycznych (prace w cyklu 8, 9 i 10)

Pierwszym etapem analizy DNA jest zazwyczaj jego izolacja i oczyszczenie. Ten etap może być stosunkowo łatwy w przypadku izolacji DNA z tkanek miękkich, krwi lub niektórych bakterii. Pasożyty są przystosowane do przetrwania w niesprzyjających warunkach. Niektóre formy życiowe pasożytów, takie jak oocysty *Cryptosporidium*, są odporne nawet na agresywne, chemiczne sposoby dezaktywacji patogenów np. wapnowanie, podobną odporność wykazują jaja *Ascaris lumbricoides* [Bean i inni 2007]. Wysoka odporność na uszkodzenia i lizę chemiczną oraz enzymatyczną może utrudniać proces dysrupcji tkanek i komórek istotny w procedurze izolacji DNA. Zagadnienie wpływu metod izolacji DNA na wyniki detekcji pasożytów w kale opisano w powiązanych ze sobą pracach 9. i 10., wchodzących w skład cyklu. Podobne badania przeprowadzono na okazach robaków przechowywanych w etanolu, formaldehydzie i zatopionych w bloczkach parafinowych, co opisano w 8. pracy z cyklu. Hipoteza badawcza w odniesieniu do obu kategorii materiału, kału i tkanek, była następująca: sposób izolacji DNA wpływa na skuteczność detekcji DNA pasożytów za pomocą reakcji łańcuchową polimerazy (PCR). Izolację DNA z kału przeprowadzono używając dwóch komercyjnie dostępnych systemów izolacji DNA. Jeden z systemów wykorzystywał lizę enzymatyczną materiału biologicznego za pomocą proteinazy K (QIAamp DNA stool mini kit, firmy Qiagen), drugi lizę chemiczną za pomocą roztworu tiocyjanianu guanidyny i detergentu Triton X-100 (NucliSENS miniMag, firmy Roche). Procedurę izolacji za pomocą zestawu NucliSENS miniMag zmodyfikowano uzupełniając ją agresywną, mechaniczną homogenizacją

przy pomocy szklanych kulek i wytrząsarki. Materiał badany stanowił kał z eksperymentalnie dodanymi oocystami *Cryptosporidium* lub larwami mięśniowymi *Trichinella* oraz próbki materiału klinicznego uzyskanego od ludzi (*Cryptosporidium*) i eksperymentalnie zarażonych myszy (*T. spiralis*). Wybór *Cryptosporidium* jako obiektu badań wydaje się oczywisty, gdyż jest to typowy patogen jelitowy a odporność jego cyst na warunki środowiska należy do jednej z najwyższych wśród pasożytów. Z kolei włośnię *T. spiralis* występują w jelicie cienkim okresowo, rozmnażają się w nim i narodzone larwy przenikają do układu krążenia a następnie do mięśni, po kilku tygodniach postaci dorosłe giną i są wydalane. Włośnię *T. spiralis* nie są pasożytami jelitowymi a jedynie ich rozmnażanie ma miejsce w jelicie. Nicienie *T. spiralis* nie są tak odporne na lizę mechaniczną i enzymatyczną jak oocysty *Cryptosporidium*, stanowiły więc model bardziej wrażliwego na warunki środowiska pasożyta. Wykrywanie obecności włośni w kale miało również inny cel, faza jelitowa włośnicy to jedyny etap zarażenia tym pasożytem, na którym można zatrzymać jego rozmnażanie i powstrzymać inwazję. Diagnostyka laboratoryjna fazy jelitowej włośnicy była i jest niedoskonała zaś opracowanie skutecznej metody diagnostyki tego etapu zarażenia mogłoby mieć znaczenie praktyczne. W trakcie prac nad oceną metod izolacji DNA wyodrębniono dwa oddzielne projekty: pierwszy skupiony ściśle na porównaniu metod izolacji DNA pasożytów z kału, opisany w 10. pracy z cyklu i drugi skupiony na śledzeniu przebiegu fazy jelitowej zarażenia *T. spiralis* i opisany w 9. pracy z cyklu. W 10. pracy z cyklu wykazano znaczący wpływ metody izolacji DNA na wyniki PCR; powielanie DNA wyizolowanego za pomocą zestawu QIAamp DNA stool mini kit nie pozwoliło na wykrycie DNA *Cryptosporidium* w żadnej z 11 pozytywnych próbek klinicznych, w których obecność oocyst pasożyta stwierdzono wcześniej metodami mikroskopowymi [Gołąb i inni 2007]. We wszystkich 11 próbkach wykryto pasożyta gdy matrycę w PCR stanowiło DNA wyizolowane przy użyciu modyfikowanej procedury NucliSENS miniMag. W obu wypadkach zastosowano tę samą reakcję nested PCR [Bajer i inni 2003]. Używając próbek kału z dodanymi oocystami ustalono, że limit detekcji dla nested PCR na matrycy DNA uzyskanego przy użyciu QIAamp DNA stool mini kit wynosił 500 oocyst dodanych do 1 g kału ludzkiego. W przypadku zestawu NucliSENS miniMag było to 100 oocyst lub mniej (nie badano ilości mniejszych niż 100 oocyst dodanych do 1 grama kału ludzkiego). Ilość całkowitego DNA izolowanego oboma zestawami była zbliżona i wydajność izolacji całkowitego DNA z kału nie tłumaczyła rozbieżności wyników PCR. Na podstawie wyników uzyskanych w 10. pracy z cyklu sformułowano wniosek, że stężenie całkowitego wyizolowanego DNA nie jest miarą skuteczności izolacji DNA pasożytów. Do podobnego wniosku doszli inni badacze zajmujący się porównaniem metod izolacji DNA *Cryptosporidium* [Jiang i inni 2005]. Ponadto stwierdzono, że zastosowanie lizy chemicznej w kombinacji z mechanicznym uszkodzeniem pasożyta pozwala uzyskać wyższą wydajność izolacji DNA pasożytów niż liza enzymatyczna. Niedawno publikowane wyniki badań potwierdziły

wnioski dotyczące relatywnie niskiej skuteczności PCR wykonanego na matrycy DNA izolowanego za pomocą QIAamp DNA stool mini kit z klinicznych próbek kału zawierających małą liczbę oocyst *Cryptosporidium* [Paulos, i inni 2016]. Metoda QIAamp DNA stool mini kit zastosowana do izolacji DNA z kału myszy zarażonych *T. spiralis* również nie pozwoliła na wykrycie DNA pasożyta (za pomocą testu PCR opracowanego do detekcji *T. spiralis* w 9. pracy z cyklu) w żadnej z próbek, które dały wynik pozytywny PCR na matrycy DNA izolowanego modyfikowaną metodą NucliSENS miniMag. W 9. pracy z cyklu opisano nową reakcję PCR do detekcji *T. spiralis* (stosowaną również w 10. pracy z cyklu). Zasady izolacji DNA były wspólne dla 9. i 10. prac z cyklu, które prowadzono równolegle. Opracowany zestaw metod izolacji i detekcji DNA, opisany w 9. pracy z cyklu, pozwolił na monitorowanie fazy jelitowej zarażenia *T. spiralis* u myszy. Było to pierwsze doniesienie w piśmiennictwie o możliwości śledzenia fazy jelitowej włośnicy za pomocą PCR. W 9. pracy z cyklu wykazano, że prawdopodobieństwo wykrycia DNA pasożyta zależało od podanej dawki infekcyjnej i czasu jaki upłynął od infekcji. Obserwacje te były zgodne z wiedzą o przebiegu fazy jelitowej włośnicy u myszy. Stwierdzono występowanie inhibitorów PCR w próbkach izolowanych z kału myszy i wykazano ich wpływ na czułość detekcji pasożyta. Uzyskane wyniki pozwoliły na wyciągnięcie wniosków o przydatności PCR do monitorowania fazy jelitowej zarażenia *Trichinella* u zwierząt laboratoryjnych i potencjalnym zastosowaniu takiego podejścia w diagnostyce ludzkiej włośnicy pod warunkiem zwiększenia czułości metody.

Obie prace z cyklu. 9. i 10, pokazały ogromny wpływ etapu izolacji DNA na czułość diagnostyczną PCR do wykrywania obecności pasożytów. Niezbędnym warunkiem uzyskania wysokiej czułości diagnostycznej testów PCR do wykrywania pasożytów jest dobór odpowiedniej metody izolacji DNA w przeciwnym wypadku czułość diagnostyczna mikroskopii świetlnej może być wyższa niż metod molekularnych. Takie zjawisko odnotowano w 10. pracy z cyklu i w najnowszych badaniach opisanych w literaturze [Laude i inni 2015, Paulos i inni 2016]. Choć PCR i real time PCR to metody o wysokiej czułości, to ilość DNA pasożyta w próbce poddanej amplifikacji może być kluczowa dla skutecznej detekcji a metody zapewniające skuteczną izolację DNA z innych organizmów mogą mieć niską skuteczność wobec pasożytów. Należy podkreślić, że zestawy przeznaczone do izolacji DNA z kału, powszechnie dostępne, uznane za referencyjne i produkowane przez renomowaną firmę nie zawsze zapewniają najlepsze wyniki, co stwierdzono w 10. pracy z cyklu oraz w niedawno opublikowanych badaniach innych zespołów [Paulos i inni 2016].

Niczenie pasożytnicze mogą występować nie tylko w kale ale również w tkankach. W 8. pracy z cyklu badano możliwość identyfikacji gatunku nicieni *Dirofilaria* z materiału klinicznego za pomocą PCR i real time PCR, mając na względzie możliwy wpływ sposobu izolacji DNA na wyniki PCR. Zamiast stosować zestaw NucliSENS miniMag, użyto odczynników przygotowanych

samodzielnie, w tym ziemi krzemkowej, która pełniła rolę złoża do adsorpcji kwasów nukleinowych zamiast kulek magnetycznych z zestawu NucliSENS miniMag. Ziemia krzemkowa zastępowała również kulki szklane do rozbijania materiału biologicznego; fragmenty tkanek ucierano za pomocą krzemionki. Zatem etap mechanicznego rozbijania i lizy chemicznej całkowicie połączono. Zasada lizy materiału biologicznego i adsorpcji na złożu pozostała taka jak w zestawie NucliSENS miniMag, czyli chemiczna i mechaniczna liza komórek oraz adsorpcja DNA do złoża w obecności soli chaotropowej - tiocyjanianu guanidyny [Boom i inni 1999]. Własną metodę izolacji DNA zaadaptowano do izolacji DNA z tkanek utrwalonych w: etanolu, formalinie i bloczku parafinowym i porównano ją z zestawem QIAamp DNA mini kit, który jest technologicznie analogiczny do zestawu QIAamp DNA stool mini kit wykorzystywanego w 10. pracy z cyklu do izolacji DNA z kału. Identyfikacja gatunku robaka na podstawie preparatu histologicznego uzyskanego ze skrawków z bloczka parafinowego może być trudna lub niemożliwa metodami mikroskopowymi, w takim przypadku identyfikacja za pomocą metod molekularnych może być jedynym wiarygodnym sposobem określenia gatunku. Z kolei w przypadku badań fragmentów robaka metody molekularne mogą służyć do potwierdzenia oznaczenia gatunku dokonanych na podstawie cech morfologicznych lub zastępować oznaczenia morfologiczne. Przy deficycie wykwalifikowanych diagnostów, biegłych w oznaczeniach morfologicznych gatunku, metody molekularne mogą zostać wybrane jako narzędzie referencyjne. Taka sytuacja wystąpiła w pierwszej dekadzie XXI wieku w Polsce, pojawił się nowy teren kraju pasożyt – *Dirofilaria repens* – wcześniej nieznaną przeważającej większości rodzimych lekarzy i diagnostów. W Polsce w tamtym czasie pracowali specjaliści, którzy posiadali potwierdzone w piśmiennictwie umiejętności identyfikowania pasożyta *Dirofilaria repens* metodami klasycznymi, byli to eksperci z: Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego [Żarnowska-Prymek i inni 2008], Wrocławskiego Uniwersytetu Medycznego [Wesołowska i inni 2010] oraz Wojewódzkiego Szpitala Zakaźnego [Żarnowska-Prymek i inni 2008], z którymi nawiązano współpracę.

W 8. pracy z cyklu, w trakcie badań nad zastosowaniem PCR w diagnostyce parazytologicznej wykazano, że skuteczność wykrywania pasożytów za pomocą PCR zależała od użytej metody izolacji DNA. Wykazano, że izolacja DNA zestawem własnej produkcji (określanym dalej jako metoda krzemionkowo-tiocyjanianowa), opisana w 8. pracy z cyklu, zapewnia wysoką wydajność izolacji DNA z pasożytów. Również w piśmiennictwie istnieją doniesienia, że testy in-house (własnej produkcji), do izolacji DNA, wykorzystujące tiocyjanian guanidyny, mogą być bardziej wydajne niż testy komercyjne [Schuurman i inni 2005]. Za pomocą metody krzemionkowo-tiocyjanianowej, z robaka przechowywanego w formalinie, otrzymano DNA, które można było wykryć wyłącznie stosując real time PCR do amplifikacji genu COI *D. repens*. Na matrycy DNA wyizolowanej za pomocą QIAamp DNA mini kit, niezależnie od rodzaju

zastosowanego PCR, wyniki pozytywne amplifikacji otrzymywano powtarzalnie tylko z preparatów DNA otrzymanych z okazów *D. repens* przechowywanych w etanolu. W PCR na matrycy DNA uzyskanego z bloczków parafinowych, za pomocą zestawu QIAamp DNA mini kit, otrzymywano wyniki pozytywne lub wątpliwie pozytywne z powtarzalnością zbyt niską do prowadzenia wiarygodnej diagnostyki. Liza enzymatyczna, okazu robaka przechowywanego w formalinie, prowadzona za pomocą zestawu QIAamp DNA mini kit nie przebiegła w pełni. Ani w PCR ani w real time PCR nie uzyskano produktów na matrycy DNA izolowanego za pomocą zestawu QIAamp DNA mini kit z robaka przechowywanego w formalinie. Na podstawie wyników real time PCR wykonanego na matrycach DNA izolowanych z bloczka parafinowego, okazów robaka przechowywanych w etanolu i formalinie wykazano, że najniższe stężenie DNA, wykrywalne w PCR występowało w próbce uzyskanej za pomocą metody krzemionkowo-tiocyanianowej z nicieni przechowywanego w formalinie. To spostrzeżenie jest zgodne z obecną wiedzą, formalina zmniejsza ilość cząsteczek DNA, które mogą służyć jako matryca w PCR [Miething i inni 2006, Do i Dobrovic 2015]. Ponadto wykazano, że zastosowanie real time PCR może zwiększyć czułość detekcji *D. repens*. Celowo jako markerów genetycznych, w badaniach w 8. pracy z cyklu, użyto trzech różnych sekwencji, dwóch występujących w wielu kopiach w genomie jądrowym, to jest w regionie międzygenowym 5.8S-ITS2-28S i fragmencie 5 SrRNA, oraz fragmentu genu mitochondrialnego oksydazy cytochromowej (COI), aby zwiększyć czułość detekcji. Amplifikację fragmentów regionów 5.8S-ITS2-28S 5SrRNA prowadzono według procedur amplifikacji DNA zmodyfikowanych w pracy 8. z cyklu, wcześniej używanych w diagnostyce weterynaryjnej [Rishniw i inni 2006]. Real time PCR do wykrywania mitochondrialnego genu COI również był modyfikacją tradycyjnego PCR opisanego w tej samej pracy [Rishniw i inni 2006]. Konwersja oryginalnego protokołu do real time PCR doprowadziła do zwiększenia czułości detekcji genu COI. Uzyskane wyniki były zgodne z przewidywaniami teoretycznymi, wyniki PCR zależały od: sposobu konserwacji użytego materiału biologicznego, wielkości powielanego produktu oraz użytej technologii PCR (real time PCR lub tradycyjny PCR). Ważny wniosek wynikający z 8. pracy z cyklu, odnoszący się do izolacji DNA z pasożytów, to stwierdzenie przewagi kombinacji lizy chemicznej z mechaniczną homogenizacją pasożytów nad izolacją za pomocą zestawu wykorzystującego lizę enzymatyczną robaków. Na podstawie uzyskanych wyników wywnioskowano, że okazów robaka przeznaczonych do analiz molekularnych nie należy przechowywać w formalinie.

W 8. pracy z cyklu po raz pierwszy w polskim piśmiennictwie naukowym przedstawiono analizę i opracowanie metod identyfikacji, nowego na terenie Polski pasożyta, *Dirofilaria repens* w materiale biologicznym używanym do diagnostyki laboratoryjnej, w tym do badań histopatologicznych. Uzyskane wyniki miały znaczenie praktyczne mianowicie do oferty badań

usługowych Zakładu Parazytologii Lekarskiej NIZP-PZH (obecna nazwa Zakład Parazytologii NIŻ-PZH) wprowadzono testy molekularne do wykrywania i identyfikacji *Dirofilaria* spp. W tamtym czasie Zakład Parazytologii Lekarskiej NIZP-PZH był jedynym laboratorium w Polsce oferującym komercyjnie badania molekularne pasożytów z rodzaju *Dirofilaria*. W oparciu o wyniki 8. pracy z cyklu przygotowano instrukcję dostarczania nicieni do badań. Zalecano by nie przechowywać nicieni w formalinie. Łatwiej nawodnić okaz nicienia przechowywany w etanolu aby zbadać cechy morfologiczne niż stosować metody amplifikacji DNA do preparatów długo przechowywanych w formalinie. Tkanki zatopione w bloczku parafinowym do przygotowania preparatów histopatologicznych (jedynie utrwalone formaliną w procesie przygotowywania do zatopienia w bloczku parafinowym) i w etanolu były dobrym materiałem do badań metodami molekularnymi.

Badania opisane w pracach 8., 9. i 10. z cyklu stanowiły wstęp do dalszych prac nad rozwojem metod diagnostyki i monitoringu chorób pasożytniczych. Bardzo ważny wniosek, który można wyciągnąć z wyników prac 8., 9. i 10. z cyklu był następujący: dokonania wstępnych badań eksperymentalnych w celu doboru metody izolacji DNA do badanego materiału jest niezbędne, nawet w przypadku planowanego użycia metod przyjętych za referencyjne. Podkreślono również wpływ sposobów utrwalania i przechowywania materiału biologicznego na skuteczność diagnostyki za pomocą PCR.

Wyniki uzyskane w trakcie realizacji zadań opisanych w pracach 8. 9. i 10. z cyklu stworzyły podstawę do dalszych badań nad nowymi na terenie Polski zarażeniami nicieniami z rodzaju *Dirofilaria* oraz do badań nad detekcją i różnicowaniem nicieni z rodzaju *Trichinella*.

Identyfikacja i różnicowanie nicieni – opracowanie i dobór testów PCR

(Prace: 3-7 z cyklu)

W pierwszej części badań opisanej w pracach 8-10 skupiono się na ustaleniu warunków, w których detekcja i identyfikacja pasożytów za pomocą PCR może być dokonana efektywnie. Kolejnym krokiem było udoskonalenie istniejących i stworzenie nowych metod detekcji i identyfikacji pasożytów. Warto wspomnieć, że, badania opisane w pracach 9., 10 oraz 4. z cyklu były prowadzone w ramach Szóstego Programu Ramowego Unii Europejskiej w obrębie Sieci Doskonałości MedVetNet (źródło finansowania jest wskazane w pracach).

Wyniki z 8. pracy z cyklu wskazywały, że real time PCR może być technologią pozwalającą zarówno na detekcję i identyfikację pasożyta, w jednej reakcji, bez potrzeby stosowania elektroforezy produktów PCR w żelu agarozowym. Z tego względu postanowiono zastosować PCR uniwersalny do amplifikacji regionów genomu obecnych w genomach *Trichinella*.

Założono, że jeden uniwersalny test real time PCR może pozwolić na wykrywanie i identyfikację kilku gatunków należących do rodzaju *Trichinella*. W obrębie genów dużej podjednostki rybosomalnego RNA (LS rRNA) wielu organizmów eukariotycznych, w tym *Trichinella*, występują regiony określane jako „expansion segment” lub „D domain” (D od ang. divergent), wykazujące się wysokim stopniem polimorfizmu sekwencji nukleotyduowej i otoczone regionami konserwatywnymi o niskiej zmienności sekwencji DNA [Chilton i inni 2003]. Region zmienny LS rRNA, a w szczególności jego fragment o nazwie Expansion Segment Five (ESV) [Zarlenga i Dame 1992], był wykorzystywany w analizach taksonomicznych *Trichinella*, ponieważ: występował w wielu gatunków rodzaju *Trichinella* i w obrębie ESV były obecne polimorfizmy na poziomie międzygatunkowym. Zróżnicowanie morfologiczne przedstawicieli rodzaju *Trichinella* jest na tyle niskie, że wiarygodna identyfikacja poszczególnych gatunków może wymagać badań molekularnych. Na podstawie wyników multiplex PCR, w którym powielane są trzy markery: Expansion Segment Five (ESV) oraz Internal Transcribed Spacer 1 i 2, można odróżniać gatunki i genotypy *Trichinella* [Zarlenga i inni 1999]. Przyjmowano, że wiele gatunków *Trichinella* można różnicować za pomocą elektroforezy produktów amplifikacji fragmentów regionu ESV [Zarlenga i inni 1999]. Za pomocą samego markera ESV nie dało się identyfikować *T. britovi*, *T. nativa*, *T. murrelli* i genotypów T6, T8, T9 oraz T12. Z regionu ESV wspomnianych genotypów powielano produkt o postulowanej długości 127 bp, określany w piśmiennictwie „127 bp fragment” [Zarlenga i inni 1999; La Rosa i inni 2001; Krivokapich i inni 2008; Pozio i inni 2009]. W badaniach, prowadzonych w ramach 4. pracy z cyklu, zdecydowano się wykorzystać technikę krzywych topnienia DNA w wysokiej rozdzielczości – High Resolution Melting (HRM) - do identyfikacji produktów amplifikacji regionu ESV. Technika HRM teoretycznie umożliwia wykrywanie jednonukleotydowych polimorfizmów. Tego typu polimorfizmów nie da się wykryć za pomocą standardowej elektroforezy żelowej powszechnie stosowanej w analizie produktów amplifikacji fragmentów regionu ESV *Trichinella*.

Postanowiono zaprojektować nową, uniwersalną parę starterów do powielania fragmentu ESV o długości odpowiedniej do analizy za pomocą HRM. Użyto startera Tsr1 opisanego wcześniej [Zarlenga i Dame 1992, Zarlenga i inni 1999] i zaprojektowano starter Trich1bis do pary. Nowy starter uniwersalny do powielania regionu ESV, użyty w 4. pracy z cyklu, zaprojektowano na podstawie sekwencji ESV: *T. zimbabwensis*, *T. papuae*, *T. pseudospiralis* i *Trichinella* T12 oraz *T. spiralis*. Założono, że starter uniwersalny dla pięciu różnych gatunków *Trichinella* powinien być uniwersalny dla większości lub wszystkich gatunków tego rodzaju. Uzyskane wyniki potwierdzały hipotezę dotyczącą uniwersalności zaprojektowanego testu PCR ponieważ wykryto za jego pomocą nieznaną wcześniej sekwencje ESV obecne u *T. nativa* i *T. britovi* (GenBank: JN971027.1, JN971026.1, JN971025.1, JN971024.1, JN971023.1, JN971022.1, JN971021.1, JN971020.1). W

GenBank znajdowała się wówczas tylko jedna, inna niż opisane w 4. pracy z cyklu, sekwencja fragmentu ESV określanego jako 127 bp region pochodząca od *Trichinella* T12 i żadna pochodząca od *T. britovi* i *T. nativa*.

Test zaprojektowany w 4. pracy z cyklu nazwano Ribo HRM, za jego pomocą można było odróżnić od siebie następujące gatunki (genotypy): *T. spiralis* (T1), *T. pseudospiralis* (T4), *T. britovi* (T3), *T. nativa* (T2). Było to istotne odkrycie ponieważ w piśmiennictwie przyjmowano, że powielany fragment ESV nie pozwalał na różnicowanie większości sylvatycznych gatunków *Trichinella* do których zalicza się *T. britovi* (T3) i *T. nativa* (T2). Ponadto przyjmowano istnienie regionu o stałej długości 127 bp, w obrębie ESV. Za pomocą krzywych topnienia w Ribo HRM można było również odróżnić od siebie poszczególne izolaty należące do jednego gatunku: *T. pseudospiralis* (T4), *T. britovi* (T3), *T. nativa* (T2). Wyniki sekwencjonowania potwierdziły występowanie różnic sekwencji w obrębie regionu ESV pomiędzy gatunkami sylvatycznymi oraz, jak wspomniano wcześniej, pomiędzy izolatami tego samego gatunku: ISS92 i ISS2 należącymi do gatunku *T. britovi* oraz ISS 7 i ISS10 należącymi do gatunku *T. nativa*. Uzyskane wyniki wskazywały, że tak zwany „127 bp region” ma zmienną długość a przekonanie o jego homogenności u poszczególnych genotypów lub gatunków najprawdopodobniej wynikało z niskiej rozdzielczości elektroforezy w żelach agarozowych, nie pozwalającej na wykrywanie nieznacznych różnic w długości produktów PCR. Zatem Ribo HRM stał się pierwszą i jedyną metodą pozwalającą w pojedynczej reakcji, bez sekwencjonowania lub elektroforezy, różnicować izolaty *T. britovi* (T3) i *T. nativa* (T2). Ponadto, w 4. pracy z cyklu po raz pierwszy wykazano, wbrew opinii przedstawianej w literaturze, że w jednym izolacie *T. britovi* i *T. nativa* może być obecnych kilka wariantów regionu ESV a ich liczba może się różnić pomiędzy izolatami. To odkrycie powinno mieć znaczenie dla badań filogenetycznych, ponieważ we wcześniejszym piśmiennictwie wyniki analiz produktów amplifikacji ESV interpretowano tak jakby każdy izolat *Trichinella* (wyłączając *T. pseudospiralis*) posiadał jeden allel sekwencji ESV [Zarlenga i inni 1999, Krivokapich 2008]. Problem zastosowania markera ESV w badaniach filogenetycznych zilustrowano w 4. pracy z cyklu na przykładzie *T. pseudospiralis*. W trakcie badań prowadzonych w ramach 4. pracy z cyklu wykazano, że zróżnicowanie sekwencji ESV uzyskanych z pojedynczego izolatu *T. pseudospiralis* może być większa niż opisana zmienność sekwencji uzyskanych z różnych izolatów pochodzących z różnych regionów geograficznych, czego nie zauważono we wcześniejszych badaniach [La Rosa 2001]. Również w 4. pracy z cyklu odkryto, i po raz pierwszy opisano, region mikrosatelitarny występujący w obrębie „127 bp fragment” należącego do regionu ESV sylvatycznych gatunków *Trichinella* (*T. britovi* i *T. nativa*). Sekwencje mikrosatelitarne w regionie ESV odkryte w 4. pracy z cyklu były pierwszymi i jedynymi sekwencjami tego regionu (GenBank: JN971027.1, JN971026.1, JN971025.1, JN971024.1, JN971023.1, JN971022.1, JN971021.1, JN971020.1), opisanymi u *T.*

britovi i *T. nativa* w czasie gdy opublikowano wspomnianą pracę. Wyniki uzyskane w 4. pracy z cyklu wskazywały, że analizy filogenetyczne oparte na sekwencjach ESV były niedoskonałe ze względu na założenie istnienia konserwatywnego regionu określanego „127 bp fragment” u gatunków sylwatycznych *Trichinella* i obecności jednej sekwencji ESV w jednym izolacie gatunków *Trichinella* spp., za wyjątkiem *T. pseudospiralis*. Powyższe przekonanie, zgodnie z wynikami 4 pracy z cyklu, wymagało rewizji w odniesieniu do: *T. britovi* i *T. nativa*. Wyniki najnowszych badań filogenetycznych, opartych na sekwencjonowaniu całych genomów [Korhonen i inni 2016], są sprzeczne z wynikami analiz filogenetycznych wykorzystujących znane sekwencje ESV. Zatem w piśmiennictwie potwierdzono sformułowane w 4. pracy z cyklu wnioski mówiące, że opinie o zależnościach filogenetycznych w obrębie rodzaju *Trichinella* w dużym stopniu zależą od technologii użytej w badaniach molekularnych stanowiących podstawę tych analiz a zależności filogenetyczne ustalone w oparciu o marker ESV mogą wymagać rewizji.

Rozważania nad zagadnieniami: prawidłowej interpretacji wyników badań molekularnych, wpływu stosowanej techniki detekcji DNA oraz projektu testu PCR na wyniki diagnostyki laboratoryjnej i wnioski epidemiologiczne przedstawione w pracach 8-10 z cyklu w 4. pracy z cyklu poszerzono o rozważania nad znaczeniem doboru technologii do oceny polimorfizmu produktów PCR. Problem interpretacji wyników w zależności od właściwości użytej metody diagnostycznej był poddany szczegółowej analizie w dalszych pracach w cyklu. Rezultaty uzyskane w 4. pracy z cyklu zwróciły uwagę na znaczenie zjawiska ograniczonej reprezentatywności sekwencji genomowych pasożytów w GenBank. Od 1999 roku do opublikowania 4. pracy z cyklu opisywano występowanie „127 bp fragment” u licznych gatunków *Trichinella*, używano tego regionu genomowego jako marker diagnostycznego podczas gdy w GenBank była tylko jedna sekwencja tzw. „127 bp fragment” należąca do *Trichinella* T12. W 4. pracy z cyklu opublikowano 8 nowych sekwencji tego fragmentu i wykazano, że marker ESV ma niedoceniany potencjał do wykorzystania w diagnostyce i epidemiologii ponieważ pozwala różnicować zarówno na poziomie gatunku *Trichinella* ale również na poziomie poszczególnych izolatów. W 4. pracy z cyklu opublikowano łącznie 13 nowych sekwencji fragmentu ESV (GenBank: JN120902.1, JN971027.1, JN971026.1, JN971025.1, JN971024.1, JN971023.1, JN971022.1, JN971021.1, JN971020.1, JN120906.1, JN120905.1, JN120904.1, JN120903.1). Wyniki uzyskane w 4. pracy z cyklu, w badaniach nad *Trichinella*, były przykładem jak ważna w diagnostyce i epidemiologii jest stała weryfikacja poglądów dotyczących stosowanych metod i markerów genetycznych w oparciu o najnowsze odkrycia.

W kolejnych pracach główny nacisk położono na badania nad nowymi na terytorium Polski, zoonotycznymi nicieniami pasożytniczymi z rodziny Onchocercidae, a w szczególności ich: wykrywaniem, identyfikacją i monitorowaniem obecności w środowisku. W realizacji projektu

finansowanego przez NCN: „*Badania rezerwuaru i wektorów, nowych na terenie Polski, pasożytniczych nicieni *Dirofilaria* sp. oraz oszacowanie ryzyka przeniesienia ich na ludzi w wybranych gminach województwa mazowieckiego.*” numer N N404 256840, wykorzystano doświadczenia zdobyte w badaniach z prac 8-10 oraz 4. pracy z cyklu. W pracach 8. i 9. z cyklu wykazano, że tylko dobrze zaprojektowany proces detekcji DNA pasożytów za pomocą PCR, sprawdzony od etapu przechowywania materiału biologicznego poprzez izolację DNA po amplifikację i detekcję, gwarantuje skuteczność detekcji równoważną lub wyższą do uzyskiwanej za pomocą mikroskopii świetlnej. Z tego względu, na początkowym etapie badań postanowiono wybrać metody molekularne odpowiednie do monitoringu zarażeń filariami z rodzaju *Dirofilaria* u psów, będących ostatecznymi żywicielami tych pasożytów i stanowiących ich rezerwuar. Na wstępie wykonano badanie przesiewowe próbek krwi psów za pomocą mikroskopii świetlnej wybrano metodykę izolacji i wykrywania DNA *Dirofilaria repens* w krwi psów za pomocą PCR. Założono, że prawidłowo dobrane metody molekularne będą mniej pracochłonne i zapewnią większą wiarygodność wyniku niż mikroskopia. Jak opisano w 7. pracy z cyklu dwie z 28 próbek krwi psów, w których za pomocą mikroskopii wykazano obecność mikrofilarii dawały negatywne wyniki w dwóch niezależnych, gatunkowo specyficznych testach PCR wykrywających *D. repens* i *D. immitis*. W badanych próbkach pozytywnych spodziewano się obecności *D. repens* potwierdzonej uprzednio u psów rasowych z hodowli na Mazowszu [Demiaszkiewicz i inni 2009], nie było wówczas doniesień o występowaniu innych filarioz u psów z terenu Polski. Jednak wynik badań mikroskopowych nie pozostawiał wątpliwości, że w dwóch próbkach krwi znajdował się pasożyt niewykrywany w PCR do detekcji genów oksydazy cytochromowej *D. repens* i *D. immitis* [Rishniw i inni 2006]. Z tego względu w 7. pracy z cyklu, aby zidentyfikować gatunek filarii wykrytych mikroskopowo, zastosowano startery uniwersalne do powielania fragmentu regionu rybosomalnego DNA 5.8S-ITS2-28S umożliwiające detekcję co najmniej 9 gatunków filarii [Rishniw i inni 2006] a produkty PCR sekwencjonowano. Takie podejście doprowadziło do pierwszego odnotowania pasożytniczego nicienia *Acanthocheilonema reconditum*, w Polsce. Wniosek wynikający z porównania czułości metod molekularnych i mikroskopowych, w odniesieniu do diagnostyki filarioz, jest analogiczny jak w przypadku wcześniejszych wniosków odnośnie diagnostyki *Cryptosporidium* – metody molekularne zapewniają wyższą czułość diagnostyczną w porównaniu z klasycznymi jedynie gdy są odpowiednio dobrane do badanego materiału. W tym miejscu należy wspomnieć, że PCR ze starterami uniwersalnymi do detekcji fragment regionu rybosomalnego DNA 5.8S-ITS2-28S zastosowany w 9. pracy z cyklu, do DNA izolowanego z preparatów histologicznych nie zapewnił wystarczającej czułości detekcji. Zatem, test PCR nieadekwatny do analiz materiału z preparatów histologicznych był odpowiedni do detekcji DNA izolowanego z krwi psów. Jest to kolejny dowód na konieczność indywidualnego

doboru odpowiedniego zestawu metod do badanego materiału biologicznego. Ponadto, wyniki uzyskane w 7. pracy z cyklu pokazały, że poszukując nowych, inwazyjnych gatunków filarii, warto stosować testy uniwersalne zamiast gatunkowo specyficznych, co uwzględniono przy projektowaniu testów PCR użytych w badaniach komarów (Diptera: Culicidae) w dalszej części cyklu prac.

Na dalszych etapach badań skupiono się na zarażeniach *D. repens* ponieważ: pasożyty te stanowiły zagrożenie dla ludzi, były nowe dla terenu Polski i istniały doniesienia o ich występowaniu w populacji psów oraz potwierdzono zarażenia *D. repens* u mieszkańców Polski [Żarnowska-Prymek i inni 2008, Wesołowska i inni 2010]. Określenie gatunku stanowiącego czynnik etiologiczny filarioz metodami mikroskopowymi jest trudna na podstawie cech morfologicznych mikrofilarii zaś czułość mikroskopii w detekcji zarażeń *D. repens* i *D. immitis* z reguły niższa niż czułość PCR. Zdecydowano się więc na badania zarażeń *Dirofilaria* spp. przy użyciu metod molekularnych. Po odkryciu obecności u psów w Polsce *A. reconditum* (w 7. pracy z cyklu) postanowiono stosować testy PCR gatunkowo specyficzne i uniwersalny pan-filarial PCR do amplifikacji regionu rybosomalnego DNA 5.8S-ITS2-28S wielu filarii [Rishniw i inni 2006]. Oszacowanie ryzyka związanego z występowaniem pasożytów z rodzaju *Dirofilaria* na terenie Mazowsza wymagało stwierdzenia czy zarażenia mają charakter lokalny czy też są importowane oraz jakie gatunki *Dirofilaria* zarażają psy. Aby osiągnąć ostatni z wymienionych celów zbadano, za pomocą PCR, krew psów z potwierdzoną mikroskopowo filariozą. Zastosowano trzy testy PCR do detekcji filarii: pan filarial PCR do detekcji kilku gatunków filarii (w tym *D. repens*, *D. immitis* oraz *A. reconditum*) i dwa testy PCR do specyficznej detekcji dwóch markerów genetycznych *D. repens*. Wszystkie zastosowane testy PCR potwierdziły zarażenie *D. repens* a 9 z 10 zarażonych psów nigdy nie podróżowało za granicę. Wyniki zaprezentowane w 6. pracy z cyklu potwierdziły rodzimy charakter zarażeń, wcześniej w piśmiennictwie potwierdzony mikroskopowo u rasowych psów hodowlanych [Demiaszkiewicz i inni 2009]. Uzyskane wyniki wspierały hipotezę przedstawioną wcześniej przez innych badaczy [Żarnowska-Prymek i inni 2008], dotyczącą prawdopodobnego, rodzimego charakteru zarażeń *D. repens* u ludzi z terenu Polski.

Rodzimy charakter zarażeń *D. repens* u ludzi był problemem do wyjaśnienia. W ramach badań prowadzonych we współpracy z kilkoma ośrodkami (WUM, WrUM, Szpital Zakaźny w Warszawie) badano przypadki ludzkiej dirofilariozy u osób z terenu Polski. Zebrano zróżnicowany materiał: okazy robaka, skrawki histologiczne z guzów izolowanych od ludzi lub skrawki samego robaka. Badania molekularne przeprowadzono na sześciu preparatach reprezentujących wszystkie kategorie wyżej wymienionych próbek. W 5. pracy z cyklu moim wkładem były analizy molekularne materiału biologicznego – koncepcja badań molekularnych wykonanie ich opis i interpretacja. W tych badaniach wykorzystano metodykę real time PCR opracowaną w 8. pracy z

cyklu. Zbadano DNA z czterech okazów robaków, i z dwóch guzów zawierających robaki. Ponadto, w wynikach analiz molekularnych uwzględniono te uzyskane w 8. pracy z cyklu. Analizy molekularne miały funkcję potwierdzenia oznaczenia gatunku zarówno w zastosowaniu do materiału ze skrawków histologicznych zatopionych w parafinie jak i okazów robaków. We wszystkich wypadkach wyniki oznaczeń molekularnych i morfologicznych były zgodne – wykryto *Dirofilaria repens*. Zastosowanie metod molekularnych pozwoliło potwierdzić trafność oznaczenia gatunku filarii na podstawie cech morfologicznych materiału. Oprócz znaczenia czysto naukowego polegającego na potwierdzeniu wyników oznaczeń gatunku partych o cechy morfologiczne materiału, miało to wymiar praktyczny w procesie publikacji wyników 5. pracy z cyklu. Dirofilarioza była nową chorobą na terenie Polski i recenzenci prac o tej chorobie oraz redaktorzy międzynarodowych czasopism naukowych oczekiwali potwierdzenia oznaczeń gatunku metodami molekularnymi.

Potwierdzono przydatność metodyki izolacji DNA filarii i jego powielania w PCR do zastosowań zarówno diagnostycznych jak i badań epidemiologicznych. W rezultacie badań przeprowadzonych w pracy 5. z cyklu udowodniono rodzimy charakter zarażeń *Dirofilaria repens* u ludzi w Polsce.

Do oceny zagrożenia dirofilariozą w Polsce brakowało danych o wstępowaniu zarażeń filariami u komarów, które są wektorami *D. repens* oraz *D. immitis*. Uniwersalny PCR, do detekcji markerów rybosomalnych, stosowany w badaniach prowadzonych w pracach 6., 7. i 8. z cyklu miał relatywnie niską czułość w porównaniu z czułością testu do wykrywania fragmentu genu podjednostki pierwszej oksydazy cytochromowej (COI) *D. repens*. W celu zapewnienia wyższej czułości reakcji i jednoczesnej detekcji *D. repens* i *D. immitis* postanowiono zaprojektować uniwersalny PCR do amplifikacji markera mitochondrialnego – genu COI. W założeniu, zaprojektowany test PCR miał znaleźć zastosowanie w monitoringu występowania zarażeń *Dirofilaria* spp. u komarów oraz ludzi i innych ssaków. W badaniach dirofilariozy ludzkiej na terenie Ukrainy, przedstawionych w 3. pracy z cyklu, po raz pierwszy użyto nowo zaprojektowanego testu PCR do detekcji i identyfikacji DNA *D. repens* i *D. immitis*. Wyniki analiz molekularnych *D. repens* izolowanych od ludzi na Ukrainie przedstawiono w 3. pracy z cyklu. W tej samej pracy zaprezentowano nową metodę identyfikacji gatunków *D. repens* i *D. immitis* na podstawie krzywych HRM. Na poziomie technologii identyfikacja oparta była na tej samej zasadzie na której opierała się metoda Ribo-HRM PCR do identyfikacji gatunków włośni, opracowana w 4. pracy z cyklu. Jak w przypadku identyfikacji *Trichinella* zastosowano startery uniwersalne i gatunek *Dirofilaria* określano na podstawie krzywych topnienia DNA. Wszystkie preparaty zbadane molekularnie w 3. pracy z cyklu zawierały DNA *D. repens* i wyniki identyfikacji gatunku na podstawie krzywych topnienia DNA uzyskanych w PCR HRM zostały potwierdzone

sekwencjonowaniem produktów PCR. Opracowano zatem metodę detekcji i identyfikacji *D. repens* i *D. immitis* w jednej reakcji.

Głównym tematem 3. pracy z cyklu była epidemiologia dirofilariozy ludzkiej na Ukrainie natomiast mój wkład tę pracę i zakres jej udziału w cyklu obejmował badania molekularne w tym opracowanie metody detekcji oraz identyfikacji *D. repens* i *D. immitis*. Test PCR użyty w 3. pracy z cyklu zaprojektowano jako metodę uniwersalną do zastosowania w diagnostyce medycznej i weterynaryjnej oraz badaniach przesiewowych występowania filarioz u żywicieli pośrednich i ostatecznych (rezerwuaru pasożyta).

Monitoring molekularny obecności filarii w komarach

Badania obecności filarii w komarach określane są terminem xenomonitoring, który oznacza pośrednią detekcję obecności pasożytów na danym terenie poprzez ich wykrywanie w komarach żerujących na żywicielach ostatecznych. Xenomonitoring za pomocą PCR jest opisywany jako xenomonitoring molekularny [Latrofa i inni 2012b]. W 1. pracy z cyklu w xenomonitoringu komarów wykorzystano doświadczenia, w opracowaniu technik izolacji DNA, zdobyte w pracach 6. 7. i 8. z cyklu oraz zastosowano test PCR do wykrywania *D. repens* i *D. immitis*, opracowany w 3. pracy z cyklu. W sumie do xenomonitoringu komarów na obecność filarii zaprojektowano trzy pary starterów uniwersalnych: jedną opisaną w 3. pracy z cyklu i dwie kolejne opisane po raz pierwszy w 1. pracy z cyklu. Wszystkie trzy pary starterów użyte w PCR pozwalały na amplifikację fragmentów tego samego markera genetycznego – genu podjednostki pierwszej oksydazy cytochromowej *Dirofilaria*. Częstość występowania infekcji *Dirofilaria* spp. w populacji komarów jest stosunkowo niska i wynosi od mniej niż jednego do kilku procent, z tego względu zastosowanie uniwersalnego PCR do detekcji dwóch gatunków (*D. repens* i *D. immitis*) w jednej reakcji było istotne z ekonomicznego punktu widzenia, ponieważ przewidywano konieczność zbadania setek lub tysięcy próbek. Zastosowanie jednej uniwersalnej reakcji detekcji, zamiast dwóch gatunkowo specyficznych, pozwalało dwukrotnie zmniejszyć liczbę przeprowadzonych PCR. Spodziewano się zróżnicowanych wyników w zależności od użytej metody jednak zakres zróżnicowania wyników był nieoczekiwany. Częstość zarażeń komarów wahała się pomiędzy 0 a 1,57% w zależności od użytej metody detekcji zastosowanej w badaniach opisanych w 1. pracy z cyklu. Znaczący wpływ metodyki na wyniki molekularnej detekcji patogenów, opisany w poprzednich pracach z cyklu, potwierdził się. Stosując duplex PCR zaprojektowany do detekcji *D. repens* i *D. immitis* [Latrofa i inni 2012a, Latrofa i inni 2012b] uzyskano 8 wyników fałszywie negatywnych w 8 próbkach dających wynik pozytywny w PCR potwierdzającym z parą starterów RepIm F0 / RepIm-R0 (conf-PCR1). Ponadto, tylko 4 z 8 próbek pozytywnych w conf-PCR1 były pozytywne również w PCR ze

starterami RepIm Fs / RepIm-R2 (conf-PCR2). Zatem wykazano ogromny wpływ metody diagnostycznej na uzyskane wyniki nie tylko ilościowe, jak w wypadku conf-PCR1 i conf-PCR2 (opracowanych w 1 pracy z cyklu) lecz również na wyniki jakościowe, ponieważ w stosując metodę duplex PCR [Latrofa i inni 2012b] i startery specyficzne wobec genu COI *D. repens* [Rishniw i inni 2006] nie wykryto żadnych zarażeń. W 1. pracy z cyklu po raz pierwszy w piśmiennictwie przedstawiono wyniki xenomonitoringu komarów na obecność *D. repens* na terenie, na którym wcześniej określono częstość występowania zarażeń *Dirofilaria* u psów (około 20%) [Osińska i inni 2014] ponadto, po raz pierwszy opisano wyniki xenomonitoringu molekularnego komarów na obecność *Dirofilaria* przeprowadzonego w Polsce.

Xenomonitoring molekularny i ocena możliwości zastosowania PCR w diagnostyce i epidemiologii

(Prace 1. i 2. z cyklu)

Wyniki badań środowiskowych (1. praca z cyklu) opisano i umieszczono w kontekście badań z zakresu xenomonitoringu prowadzonych w Europie (1. i 2. praca z cyklu). Obie te prace (1. i 2. z cyklu) stanowią zarówno podsumowanie jak i rozwinięcie moich poprzednich badań nad wpływem doboru metod molekularnych na wyniki diagnostyki i badań epidemiologicznych. Na etapie projektowania można przewidzieć pewne ograniczenia czułości i specyficzności testów PCR. Teoretyczne oszacowanie właściwości testu PCR powinno być rutynowo stosowane przy projektowaniu testów do laboratoryjnej diagnostyki medycznej. Podobnie restrykcyjne podejście nie jest powszechnie przyjęte wśród osób zajmujących się badaniami podstawowymi i środowiskowymi a świadomość ryzyka związanego z wadami projektu metody, szczególnie związanego z opieraniem się na nieaktualnych danych może być niska, co wykazano w 1. i 2. pracy z cyklu. W pierwszej pracy z cyklu zaobserwowano, że dwie metody detekcji *D. repens* opisane w literaturze [Latrofa i inni 2012b, Rishniw i inni 2006] nie pozwoliły na wykrycie *D. repens* w pozytywnych próbkach DNA izolowanego z komarów w Polsce. Druga ze wspomnianych metod [Rishniw i inni 2006] była używana z powodzeniem w poprzednich pracach z cyklu (5., 6. i 8.) w zastosowaniu do materiału innego niż komary. Wszystkie startery PCR stosowane do detekcji filarii w 1. pracy z cyklu poddano analizie za pomocą National Center Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool Basic Local Alignment Search Tool (NCBI BLAST) [Altschul i inni 1990, Zhang i inni 2000] aby sprawdzić czy występują możliwe do wykrycia czynniki potencjalnie redukujące wydajność testów. Okazało się, że w metodzie duplex PCR [Latrofa i inni 2012b] startery do amplifikacji markera 12S rRNA zaprojektowano w regionie polimorficznym i pasowały idealnie tylko do jednego z trzech znanych wariantów sekwencji genów 12S rRNA obecnych w GenBank. W momencie projektowania starterów używanych w duplex PCR nie znano dwóch wariantów sekwencji genów 12S rRNA do których te primery były tylko częściowo komplementarne, co pokazuje niedoskonałość projektu Latrofa i inni 2012a,b. Jest to przykład jak istotne jest regularne sprawdzanie zgodności projektu testu diagnostycznego z obecną wiedzą. W zastosowaniu do próbek z Polski duplex PCR wykazał znikomą czułość (8 fałszywie negatywnych wyników w 8 próbkach pozytywnych w conf-PCR1). Problemy z czułością duplex PCR wobec genotypów *D. repens* wykrywanych w Europie Centralnej przewidziano teoretycznie, w 1. pracy z cyklu. Przewidywania oparto na analizie temperatury topnienia starterów hybrydujących z nie w pełni komplementarnymi sekwencjami wiązania starterów. W 1. pracy z cyklu zwrócono ponadto uwagę na terminologię stosowaną do opisu czułości. Czułość analityczną definiuje się w odniesieniu do

PCR jako stężenie DNA lub liczbę cząsteczek DNA jaką wykrywa test. Czulość diagnostyczna to wartość opisująca skuteczność testu diagnostycznego w wykrywaniu występowania patogenu (lub choroby) u zarażonego organizmu. Paradoksalnie test o wysokiej czulości analitycznej, taki jak duplex PCR, może mieć niską czulość diagnostyczną. W 1. pracy z cyklu wskazano, że taka sytuacja może mieć miejsce w przypadku 2/3 znanych alleli genu 12S rRNA wykrywanych w duplex PCR. Takie zjawisko ma miejsce gdy czulość analityczna jest wysoka tylko w odniesieniu do niektórych genotypów wykrywanego markera i niska dla pozostałych [Saah i Hoover 1997]. Parametr o kluczowym znaczeniu dla diagnostów i epidemiologów to czulość diagnostyczna. Zarówno duplex PCR lecz również specyficzny PCR do detekcji *D. repens* za pomocą pary starterów DR COI F1 / DR COI R1 miał niską czulość diagnostyczną. Także w tym przypadku teoretyczne przeprowadzania dokonane w 1. pracy z cyklu wykazały, że zgodnie z najnowszą wiedzą starter DR COI R1 [Rishniw i inni 2006] był w pełni komplementarny tylko do części sekwencji alleli genów COI *Dirofilaria repens* zdeponowanych w Genbank, miał jedną niesparowaną zasadę z wszystkimi sekwencjami genu COI wykrytymi w 1. pracy z cyklu u komarów z Polski (GenBank: KM370876.1, KM370875.1, KM370874.1, KM370873.1, KM370872.1, KM370871.1, KM370870.1, KM370869.1, KM370868.1, KM370867.1) co mogło mieć wpływ na czulość PCR. Należy zaznaczyć, że wiedza o polimorfizmach sekwencji DNA mogących upośledzać parametry testów opracowanych przez Rishniw i inni 2006 oraz Latrofa i inni 2012 a,b pojawiła się już po opisanu każdego z tych testów, co potwierdza konieczność systematycznego sprawdzania zgodności projektów testów diagnostycznych z najnowszą wiedzą.

Polimorfizmy w obrębie miejsca wiązania startera mogą redukować czulość PCR, z drugiej strony obecność nawet kilku niesparowanych zasad w obrębie startera może nie eliminować reakcji niespecyficznych co opisano w 1. pracy z cyklu na przykładzie par starterów uniwersalnych. Przesiewowy PCR, opracowany i użyty w 1. pracy z cyklu, miał najwyższą czulością detekcji *D. immitis* spośród wszystkich zastosowanych testów PCR, pomimo obecności jednej niesparowanej zasady w obrębie miejscach wiązania starterów.

W 1. pracy z cyklu potwierdzono, że występowanie jednej lub więcej niż jednej niesparowanych zasad może lecz nie musi eliminować amplifikacji DNA w reakcji PCR jak w przypadku PCR potwierdzającego conf PCR1 w zastosowanego do detekcji *A. reconditum*. Paradoksalnie dzięki niespecyficznej amplifikacji za pomocą nie w pełni komplementarnych starterów, w 1. pracy z cyklu, po raz pierwszy w Polsce wykryto zarażenia nicieniem *Setaria tundra* u komarów. Podobne zjawisko wystąpiło w badaniach niemieckich [Czajka i inni 2012]. Jednym z wniosków 1. pracy z cyklu było stwierdzenie, że ograniczona specyficzność gatunkowa PCR, spowodowana reakcjami niespecyficznymi, może stać się zaletą jeśli jako metodę potwierdzenia wyników PCR stosuje się sekwencjonowanie – w ten sposób po raz pierwszy wykryto *S. tundra* w

komarach w Polsce i w Niemczech. Niedoskonałości testu PCR nie dyskwalifikują go w zastosowaniu do naukowych badań przesiewowych, niezbędna jest jednak świadomość ich wpływu na wyniki i w konsekwencji na formułowane wnioski. W 1. pracy z cyklu w sposób wyczerpujący omówiono problemy występujące przy projektowaniu testów PCR do diagnostyki pasożytów, na modelu filarii.

Właściwości testu molekularnego a jego zastosowanie w ocenie sytuacji epidemiologicznej (prace 1. i 2. z cyklu)

W trakcie badań napotkano na problemy w interpretacji wyników uzyskanych w xenomonitoringu komarów na obecność filarii. W 2. pracy z cyklu poddano ponownej analizie dane zaprezentowane w pierwszej niemieckiej pracy poświęconej xenomonitoringowi komarów na obecność *D. repens* [Czajka i inni 2012] i zauważono istotne problemy z zasadnością sformułowanych wniosków. Znaczącym problemem, zasygnalizowanym w drugiej pracy z cyklu, jest interpretacja biologiczna, lub epidemiologiczna ujemnego wyniku PCR. Na podstawie ujemnych wyników molekularnego xenomonitoringu komarów na obecność *D. repens* Czajka i inni 2012 uznali, że ryzyko wystąpienia rodzimych zarażeń *D. repens* w Niemczech było bardzo niskie. W 2. pracy z cyklu, zwrócono uwagę, że brak kontroli pozytywnych i negatywnych nie pozwalał stwierdzić czy wyniki xenomonitoringu Czajka i inni 2012 były wiarygodne a brak danych o czułości i specyficzności zastosowanych testów PCR nie pozwalał stwierdzić czy wyniki negatywne były fałszywie czy prawdziwie negatywne. Ponadto wyniki pozytywne testu przesiewowego, nawet te, które w testach potwierdzenia (PCR potwierdzający i sekwencjonowanie) były negatywne traktowano jako wynik pozytywny testu na obecność filarii. W efekcie, jak wykazano w pracy 2. z cyklu, wyciągnięto nieuprawnione wnioski epidemiologiczne odnośnie zagrożenia rodzimą dirofilariozą w Niemczech myląc pojęcia wyniku pozytywnego PCR i potwierdzonej detekcji pasożyta. Najważniejsze jednak było nieuprawnione uznanie, że wynik negatywny metody o nieznannej czułości potwierdza brak zarażenia co doprowadziło do nieuzasadnionej oceny stopnia zagrożenia epidemiologicznego. Analogiczny problem występował w badaniach z zakresu xenomonitoringu komarów przeprowadzonych w Niemczech w 2014 roku [Czajka i inni 2014] w których wykryto zarażenia *D. repens* ale i tym razem nie zbadano ani czułości ani specyficzności stosowanych testów PCR. W 1. pracy z cyklu zwrócono uwagę, że w trzech pracach z zakresu xenomonitoringu komarów na obecność *D. repens*, przeprowadzonych na tych samych terenach, uzyskano sprzeczne wyniki [Czajka i inni 2012, Czajka i inni 2014, Kronefeld i inni 2014]. We wszystkich trzech wyciągnięto wnioski natury epidemiologicznej, w dwóch określono częstość zarażeń. Występowanie zarażeń *D. repens* u psów na terenie Niemiec było potwierdzone i jak pokazano w pracy 1. pierwszej z cyklu zarażone komary wykryto tam gdzie

zarażone psy jednak w żadnych z badań xenomonitoringu nie określono prawidłowo wszystkich regionów występowania dirofilariozy, a w pracy Czajka i inni 2012 żadnego z tych regionów. Jak wykazano w 1. pracy z cyklu wspólną cechą wymienionych prac jest błędna interpretacja wyników negatywnych PCR jako potwierdzenia nieobecności pasożyta. Z punktu widzenia zdrowia publicznego prawidłowa interpretacja wyników badań przesiewowych ma znaczenie jeśli prowadzi do wniosków o występowaniu lub niewystępowaniu zagrożenia epidemiologicznego. Powyższe spostrzeżenia doprowadziły do wniosku o ograniczonej przydatności wyników europejskiego xenomonitoringu filarioz do oceny sytuacji epidemiologicznej.

Jak wcześniej wspomniano czułość diagnostyczna PCR stosowanych w badaniach opisanych w 1. pracy z cyklu różniła się znacząco. Do opisu wyników wprowadzono terminy Estimated Detection Rate (EDR, Szacowana Częstość Detekcji) oraz Estimated Infection Rate (EIR - szacowana częstość Infekcji). Szacowana Częstość Detekcji (EDR) – to szacowana częstość z jaką dana metoda diagnostyczna wykrywa zarażenie zaś Szacowana Częstość Infekcji – to szacowana częstość z jaką występuje zarażenie. Szacowana Częstość Detekcji (EDR) dostarcza informacji jak skutecznie dana metoda PCR wykrywa DNA i tylko jeśli metoda ma doskonałą czułość diagnostyczną wartość EDR odpowiada rzeczywistej częstości zarażeń. Natomiast jeśli metoda ma niską i nieokreśloną czułość diagnostyczną wartość EDR nie ma żadnego znaczenia biologicznego. W 1. i 2. pracy z cyklu zaznaczono, że wartości EDR i EIR są ze sobą mylone w piśmiennictwie i EDR bywa używane jako miara częstości zarażeń a w efekcie wnioski epidemiologiczne wyciągane są na podstawie właściwości użytego testu PCR zamiast na podstawie wiarygodnie szacowanej częstości zarażeń. W 1. pracy z cyklu podano przykłady sprzeczności pomiędzy wynikami oszacowań częstości zarażeń komarów a statusem zarażeń psów w różnych krajach europejskich, wskazujące na niską wiarygodność dokonanych ocen częstości zarażeń komarów. Wskazano, że PCR jest jedynie narzędziem i zawsze analizując wyniki PCR należy zadać sobie pytanie czy nie stoją one w sprzeczności z biologią i epidemiologią badanych organizmów? Odpowiedź na to pytanie pozwoli krytycznie ocenić wartość uzyskanych wyników xenomonitoringu. W pierwszej pracy z cyklu po raz pierwszy w piśmiennictwie dokonano próby porównania wyników licznych badań z zakresu xenomonitoringu dirofilariozy prowadzonych w Europie.

W tytule 1. pracy z cyklu zadano pytanie o sens xenomonitoringu jako narzędzia do monitorowania zagrożenia chorobami przenoszonymi przez wektory. Zwrócono uwagę, że choć xenomonitoring niewątpliwie pozwolił wykryć obecność filarii w wielu krajach europejskich to szereg niezależnych badań niewiele wniósł do wiedzy na temat częstości zarażeń filariami w poszczególnych krajach; jak wykazano w 1. pracy z cyklu metody stosowane do xenomonitoringu we Włoszech i na Słowacji, prowadziły do zaniżania szacunków częstości zarażeń komarów filariami w Polsce. Wyników oszacowań częstości zarażeń komarów dokonanych w różnych krajach nie dało się

porównać ponieważ względna czułość i specyficzność metod użytych w różnych, europejskich badaniach z zakresu xenomonitoringu komarów na obecność *Dirofilaria* była nieznaną.

Xenomonitoring miał wartość jako forma potwierdzenia występowania filarii u komarów jednak jako forma wykluczenia obecności tych pasożytów nie posiadał takiej wartości. Na obecnym etapie europejskich badań z zakresu xenomonitoringu komarów na obecność filarii nawet wyniki niezależnych badań przeprowadzonych w jednym kraju nie nadają się do zastosowań epidemiologicznych, co obszernie dyskutowano w 1. pracy z cyklu. Kolejny wniosek płynący z 1. pracy z cyklu to stwierdzenie dotyczące nieistnienia idealnej pary starterów do xenomonitoringu komarów, za pomocą PCR, na obecność filarii. W pierwszej pracy z cyklu wykazano, że najlepszym rozwiązaniem jest stosowanie kombinacji metod a żaden z testów PCR, włącznie z opracowanymi w 1. pracy z cyklu, nie może być uznany za pojedynczą, najbardziej skuteczną metodę xenomonitoringu. Zaznaczono, że stworzenie idealnego testu PCR do detekcji wszystkich genotypów konkretnego gatunku pasożyta (lub innego organizmu) jest mało prawdopodobne. Odpowiedzią na pytanie zadane w tytule 1. pracy z cyklu jest stwierdzenie, że należy dokonać porównania poziomu ekwiwalentności lub standaryzacji metod xenomonitoringu komarów na obecność filarii aby móc porównywać sytuację epidemiologiczną w poszczególnych krajach. Ponadto wskazano, że wyniki analiz częstości zarażeń w populacji żywicieli ostatecznych są potrzebne aby móc określić zależność między częstością zarażeń u żywicieli ostatecznych i komarów. Pierwsza praca z cyklu jest zwięźczeniem doświadczeń zebranych w pozostałych pracach z cyklu dotyczących zagadnień z pogranicza diagnostyki, epidemiologii i monitoringu nowo pojawiających się zagrożeń parazytologicznych.

Podsumowanie

W całym cyklu starano się zwracać uwagę na wpływ użytej technologii na interpretację wyników diagnostyki PCR i możliwości wykorzystania ich w analizach epidemiologicznych. Podkreślano znaczenie poszczególnych etapów procedury diagnostyki molekularnej, od przechowywania materiału biologicznego poprzez izolację DNA do jego amplifikacji. Wykazano, że niedostosowanie któregośkolwiek etapu procedury detekcji DNA do właściwości badanych pasożytów może zaowocować obniżoną czułością lub specyficznością testu diagnostycznego. Podkreślano też, że nie istnieją idealne metody diagnostyczne i to nie niedoskonałość metod prowadzi do błędnych wniosków tylko nieświadomość ograniczeń stosowanych narzędzi diagnostycznych i dopuszczalnego zakresu ich zastosowań. Użycie metody nieadekwatnej do celu jaki planuje się osiągnąć prowadzi do formułowania nieuprawnionych wniosków diagnostycznych i epidemiologicznych. Podkreślano, że nieświadomość właściwości diagnostycznego PCR stanowi

duże i pomijane ryzyko w interpretacji wyników diagnostycznych. Wyniki badań diagnostycznych są wykorzystywane w medycynie i analizach epidemiologicznych, na skutek czego mają pośredni wpływ na zdrowie publiczne. Jakość diagnostyki medycznej analiz epidemiologicznych zależy od jakości danych uzyskanych w testach PCR i prawidłowej ich prawidłowej interpretacji.

W cyklu prac podkreślono specyfikę molekularnej diagnostyki chorób pasożytniczych wynikającą ze stosunkowo małej wiedzy o genomach pasożytów. Ponadto przedstawiono unikalne problemy występujące przy wdrażaniu metod diagnostycznych do wykrywania i monitoringu pasożytów nowych na terenie licznych krajów europejskich, w tym Polski. W cyklu prac wykazano, że metody lub markery genetyczne używane od lat mogą mieć inne właściwości niż sądzono. Z tego względu poglądy na temat metod diagnostycznych oraz na procedury diagnostyczne powinno się rewidować adekwatnie do najnowszych odkryć.

Omówienie pozostałych osiągnięć naukowych

Moja działalność w dziedzinie nauki od początku skupiała się na opracowaniu i zastosowaniu metod diagnostycznych wykorzystujących techniki amplifikacji i detekcji DNA. Większość prowadzonych przeze mnie badań obejmowała wykrywanie i identyfikację organizmów patogennych. W trakcie badań prowadzonych w ramach doktoratu zajmowałem się opracowaniem metod różnicowania bakterii. W efekcie powstały dwie publikacje oraz dwa patenty:

Masny A, Plucienniczak A. Fingerprinting of bacterial genomes by amplification of DNA fragments surrounding rare restriction sites. *Biotechniques*. 2001, 31(4):930-4, 936

Masny A, Plucienniczak A. Ligation mediated PCR performed at low denaturation temperatures--PCR melting profiles. *Nucleic Acids Res*. 2003, 31(18):e114.

Patent numer: PL355876. Wynalazcy: Plucienniczak Andrzej [Pl]; Masny Aleksander [Pl]; Wolinowska Renata [Pl] Zgłaszający: Inst Biotechnologii i Antybiot [Pl]. Sposób otrzymywania fragmentów charakteryzujących badany DNA.

Patent numer: PL342419. Wynalazcy: Plucienniczak Andrzej [Pl]; Masny Aleksander [Pl]; Plucienniczak Grazyna [Pl] Zgłaszający: Inst Biotechnologii i Antybiot [Pl]. Sposób otrzymywania reprezentacji fragmentów DNA charakterystycznych dla danego genomu, zwłaszcza genomu bakterii.

Obie powyżej wymienione metody opisano jako narzędzia umożliwiające różnicowanie szczepów bakterii i w takim zastosowaniu były używane przez liczne zespoły badawcze. Pierwsza z nich *Fingerprinting of bacterial genomes by amplification of DNA fragments surrounding rare*

restriction sites jest w piśmiennictwie określana jako ADSRRS, gdyż taki skrót przypisali jej badacze wykorzystujący ją do badań nad szczepami klinicznymi (Krawczyk i inni 2003).

Również w badaniach prowadzonych po doktoracie stosowałem metody ADSRRS i PCR melting profiles (PCR-MP). We współpracy z Instytutem Biochemii Technicznej, Politechniki Łódzkiej, z powodzeniem zastosowano metodę PCR-MP do znalezienia różnic pomiędzy genomami szczepów *Acetobacter xylinum* produkujących i nieprodukujących celulozę. Uzyskane za pomocą PCR-MP wyniki pomogło w określeniu jednej z możliwych przyczyn różnic we właściwościach badanych szczepów:

Krystynowicz A, Koziolkiewicz M, Wiktorowska-Jeziarska A, Bielecki S, Klemenska E, Masny A, Plucienniczak A. Molecular basis of cellulose biosynthesis disappearance in submerged culture of Acetobacter xylinum. Acta Biochim Pol. 2005, 52(3):691-8

Obie metody PCR-MP oraz ADSRRS, we współpracy z Katedrą Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego, z powodzeniem zastosowano do różnicowania patogenów pomidorów, bakterii *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*:

Olczak-Woltman, H, Masny A, Bartoszewski G, Plucienniczak A, Niemirowicz-Szczytt K. Genetic diversity of Pseudomonas syringae pv. lachrymans strains isolated from cucumber leaves collected in Poland. Plant Pathology 2007, 56, 373–382.

Jako pracownik Zakładu Parazytologii Lekarskiej (obecnie Zakład Parazytologii), Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny, zajmowałem się zastosowaniem metod molekularnych w badaniach parazytologicznych. Większość prac z tego zakresu ujęto w omówieniu cyklu prac w autoreferacie. Poniżej omówione są prace nieujęte w cyklu prac.

W latach 2009-2011 w Zakładzie Parazytologii NIZP-PZH pracowałem w zespole zajmującym się nowymi na terenie Polski, przenoszonymi przez wektory nicieniami pasożytniczymi. Większą część swoich badań poświęciłem problemowi nicieni *Dirofilaria* i wywoływanej przez nie choroby – dirofilariozy. W piśmiennictwie pojawiła się tendencja do opisywania problemu dirofilariozy w zawężonej perspektywie. Problem postrzegano jedynie z punktu widzenia krajów, w których dirofilarioza występowała od dziesięcioleci lub stuleci albo z punktu widzenia pojedynczego kraju. W pracy:

Masny A, Gołab E, Cielecka D, Salamatin R. Vector-borne helminths of dogs and humans - focus on central and eastern parts of Europe. Parasit Vectors. 2013 6:38.

zweryfikowano opinie autorów zachodnich dotyczące zasięgu występowania nicieni pasożytniczych z rodzaju *Dirofilaria* w Europie. Wskazano, że dane zachodnie nie odzwierciedlały skali inwazji *Dirofilaria* na nowe tereny w Europie. Podkreślono wagę badań prowadzonych w Europie Centralnej i Wschodniej, w szczególności badań polskich. Praca ta miała znaczenie dla zwiększenia rozpoznawalności polskich badań nad dirofilariozą i wskazania zachodnim badaczom, że prezentowane przez nich poglądy na epidemiologię dirofilariozy wymagały rewizji.

Problem zawężonej perspektywy w postrzeganiu problemu dirofilariozy dotyczył też badaczy z krajów wschodnioeuropejskich. W pracy:

*Masny A, Salamatin R, Cielecka D, Kharchenko VO, Conn DB, Golab E. Human dirofilariasis due to *Dirofilaria repens* in the Russian Federation-remarks concerning epidemiology. Int J Infect Dis. 2014, 28:225.*

zwrócono uwagę, na nieuwzględnienie informacji o sytuacji epidemiologicznej dirofilariozy na Ukrainie w badaniach, o charakterze epidemiologicznym, prowadzonych w Rosji, na terenach graniczących z Ukrainą. Wskazano, że w świetle badań międzynarodowych (w tym prowadzonych w 3. pracy z cyklu przedstawionej w autoreferacie) postawione hipotezy, dotyczące przyczyn epidemii dirofilariozy w Rosji wymagały uzupełnienia i modyfikacji. Również ta publikacja miała na celu zaznaczenie wpływu badań prowadzonych przez badaczy z Polski i Ukrainy na zrozumienie problemu dirofilariozy w Europie.

Inne z prac badawczych miały bardziej użyteczny charakter. Jak wspomniano w autoreferacie, w Zakładzie Parazytologii NIZP-PZH prowadzono badania diagnostyczne dirofilariozy. Te badania pozwalały nawiązywać współpracę naukową i owocowały opisami przypadków. Zatem prowadzone badania miały wymiar praktyczny w postaci współpracy z lekarzami i przedstawiania problemu dirofilariozy z perspektywy klinicznej:

*Mazur-Melewska K, Figlerowicz M, Masny A, Cielecka D, Mania A, Trejster E, Kemnitz P, Służewski W. The first autochthonous infection with *Dirofilaria repens* in a child in Poland. Journal of Pediatric Infectious Diseases 2013, 8(4):187-190*

Borkowski PK, Rymkiewicz G, Golebiewska J, Nestoros N, Romejko-Jarosinska Zarnowska-Prymek H, Masny A, Palucki J, Cielecka D. The first case of human autochthonous subconjunctival

dirofilariosis in Poland and MALT lymphoma as possible consequence of this parasitosis. Infect Agent Cancer. 2015, 10(1):1.

W ramach współpracy z innym ośrodkami naukowymi prowadziłem analizę wyników badań molekularnych i brałem udział w przygotowaniu pracy dotyczącej monitoringu molekularnego obecności wirusa TBEV u kleszczy:

Biernat B, Karbowski G, Stańczak J, Masny A, Werszko J. The first detection of the tick-borne encephalitis virus (TBEV) RNA in Dermacentor reticulatus ticks collected from the lowland European bison (Bison bonasus bonasus L.). Acta Parasitol. 2016, 1;61(1):130-5.

Do innych moich aktywności związanych z upowszechnianiem wiedzy o chorobach pasożytniczych, ich epidemiologii i leczeniu należało napisanie rozdziałów w monografii, przeznaczonej do użytku przez lekarzy:

Masny A., 2014. Włosogłówczyca. In A. Baumann-Popczyk, M. Sadkowska-Todys, & A. Zieliński, eds. Choroby zakaźne i pasożytnicze - epidemiologia i profilaktyka. Bielsko-Biała, pp. 477–479.

Masny A., 2014. Glistnica. In A. Baumann-Popczyk, M. Sadkowska-Todys, & A. Zieliński, eds. Choroby zakaźne i pasożytnicze - epidemiologia i profilaktyka. Bielsko-Biała, pp. 123–126.

Masny A., 2014. Owsica. In A. Baumann-Popczyk, M. Sadkowska-Todys, & A. Zieliński, eds. Choroby zakaźne i pasożytnicze - epidemiologia i profilaktyka. Bielsko-Biała, pp. 318–321.

Oprócz działalności czysto naukowej, Zakład Parazytologii NIZP-PZH, którego jestem pracownikiem stara się dążyć do wdrażania i komercjalizacji wyników badań. Jestem współautorem zgłoszeń patentowych:

Międzynarodowe zgłoszenie patentowe PCT/IB2016/052655. Wioletta Rożej-Bielicka, Aleksander Masny, Elżbieta Gołąb. Zgłaszający: Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny (Zgłoszenie międzynarodowe w trybie PCT). Method of detection and/or identification of protozoa of genus Babesia, primer for use in this method and kit for use in methods of diagnosis of symptomatic and asymptomatic babesiosis.

Krajowe zgłoszenie patentowe 412309. Wioletta Rożej-Bielicka, Aleksander Masny, Elżbieta Gołąb. Zgłaszający: Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny. Sposób wykrywania i/lub identyfikacji pierwotniaków z rodzaju Babesia, starter do

zastosowania w tym sposobie oraz zestaw do stosowania w sposobach diagnostyki objawowej i bezobjawowej

Inne obowiązki

Jestem członkiem zespołu laboratorium BSL3 (Biosafety level 3) i zostałem przeszkolony w detekcji patogenów wirusowych 3. grupy zagrożenia.

Pozostałe aktywności związane z moją działalnością naukową i dydaktyczną wymieniłem w załączniku 4. do niniejszego autoreferatu.

Podsumowując, większość badań, w których brałem udział związana była z zastosowaniem metod molekularnych w diagnostyce i epidemiologii chorób zakaźnych.

Podstawowe parametry bibliometryczne według bazy Web Of Science:

Liczba prac indeksowanych: 18

Liczba prac z informacją o cytowaniach w Web Of Science: 16

Liczba cytowań: 158 (według metodyki obliczeń WUM, bez autocytowań, 139)

Index Hirsch'a: 9

Suma IF wszystkich opublikowanych prac: 35,53

Piśmiennictwo

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–10. [http://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](http://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

Bajer, A., Cacciò, S., Bednarska, M., Behnke, J. M., Pieniazek, N. J., & Sinski, E. (2003). Preliminary molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates of wildlife rodents from Poland. *The Journal of Parasitology*, 89(5), 1053–5.

Bean, C. L., Hansen, J. J., Margolin, A. B., Balkin, H., Batzer, G., & Widmer, G. (2007). Class B alkaline stabilization to achieve pathogen inactivation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 4(1), 53–60.

Boom, R., Sol, C., Beld, M., Weel, J., Dillen, P. W., Weel, J. a N., & Goudsmit, J. (1999). Improved Silica-Guanidiniumthiocyanate DNA Isolation Procedure Based on Selective Binding of

Bovine Alpha-Casein to Silica Particles Improved Silica-Guanidiniumthiocyanate DNA Isolation Procedure Based on Selective Binding of Bovine Alpha-Casein to Silica, 37(3), 615–619.

Chilton, N. B., Huby-Chilton, F., & Gasser, R. B. (2003). First complete large subunit ribosomal RNA sequence and secondary structure for a parasitic nematode: Phylogenetic and diagnostic implications. *Molecular and Cellular Probes*, 17(1), 33–39.

Czajka, C., Becker, N., Jöst, H., Poppert, S., Schmidt-Chanasit, J., Krüger, A., & Tannich, E. (2014). Stable transmission of *Dirofilaria repens* nematodes, northern Germany. *Emerging Infectious Diseases*, 20(2), 328–31.

Czajka, C., Becker, N., Poppert, S., Jöst, H., Schmidt-Chanasit, J., & Krüger, A. (2012). Molecular detection of *Setaria tundra* (Nematoda: Filarioidea) and an unidentified filarial species in mosquitoes in Germany. *Parasites & Vectors*, 5(1), 14.

Demiaszkiewicz, A. W., Polańczyk, G., Pyziel, A. M., Kuligowska, I., & Lachowicz, J. (2009). Pierwsze ogniska dirofilariozy psów wywołanej przez *Dirofilaria repens* Railliet et Henry, 1911 w centralnej Polsce = [The first foci of dirofilariosis of dogs evoked by *Dirofilaria repens* Railliet et Henry, 1911 in central Poland]. *Wiadomości Parazytologiczne*, 55(4), 367–70.

Do, H., & Dobrovic, A. (2015). Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: Causes and strategies for minimization. *Clinical Chemistry*, 61(1), 64–71.

Gołąb, E., Waloch, M., Rozej W., Wernik, T., Piotrowska, M., Wąsik, M., & Dzbeński, T. H. (2007) Evaluation of prevalence of *Cryptosporidium* spp. in children with diarrhoea. *Wiad Parazytol.*, 53 (suppl): 103.

Jiang, J., Alderisio, K. A., Singh, A., & Xiao, L. (2005). Development of procedures for direct extraction of *Cryptosporidium* DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1135–1141.

Korhonen, P. K., Pozio, E., La Rosa, G., Chang, B. C. H., Koehler, A. V., Hoberg, E. P., & Gasser, R. B. (2016). Phylogenomic and biogeographic reconstruction of the *Trichinella* complex. *Nature Communications*, 7(February), 10513.

Krawczyk, B., Lewandowski, K., Bronk, M., Samet, A., Myjak, P. S., & Kur, J. (2003). Evaluation of a novel method based on amplification of DNA fragments surrounding rare restriction sites (ADSRRS fingerprinting) for typing strains of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Journal of Microbiological Methods*, 52(3), 341–351.

Krivokapich, S. J., Prous, C. L. G., Gatti, G. M., Confalonieri, V., Molina, V., Matarasso, H., & Guarnera, E. (2008). Molecular evidence for a novel encapsulated genotype of *Trichinella* from Patagonia, Argentina. *Veterinary Parasitology*, 156(3–4), 234–40.

Kronefeld, M., Kampen, H., Sassnau, R., & Werner, D. (2014). Molecular detection of *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* and *Setaria tundra* in mosquitoes from Germany. *Parasites & Vectors*, 7, 30.

La Rosa, G., Marucci, G., Zarlenga, D. S., & Pozio, E. (2001). *Trichinella pseudospiralis* populations of the Palearctic region and their relationship with populations of the Nearctic and Australian regions. *International Journal for Parasitology*, 31(3), 297–305.

La Rosa, G., Marucci, G., Zarlenga, D. S., & Pozio, E. (2001). *Trichinella pseudospiralis* populations of the Palearctic region and their relationship with populations of the Nearctic and Australian regions. *International Journal for Parasitology*, 31(3), 297–305.

Latrofa, M. S., Dantas-Torres, F., Annoscia, G., Genchi, M., Traversa, D., & Otranto, D. (2012 a). A duplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection of and differentiation between *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in dogs and mosquitoes. *Veterinary Parasitology*, 185(2–4), 181–5.

Latrofa, M. S., Montarsi, F., Ciocchetta, S., Annoscia, G., Dantas-Torres, F., Ravagnan, S., Otranto, D. (2012 b). Molecular xenomonitoring of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in mosquitoes from north-eastern Italy by real-time PCR coupled with melting curve analysis. *Parasites & Vectors*, 5(1), 76.

Laude, A., Valot, S., Desoubreaux, G., Argy, N., Nourrisson, C., Pomares, C., Morio, F. (2016). Is real-time PCR-based diagnosis similar in performance to routine parasitological examination for the identification of *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum*/*Cryptosporidium hominis* and *Entamoeba histolytica* from stool samples? Evaluation of a new. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(2), 190.e1-190.e8.

Miething, F., Hering, S., Hanschke, B., & Dressler, J. (2006). Effect of fixation to the degradation of nuclear and mitochondrial DNA in different tissues. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 54(3), 371–374.

Osińska, B., Demiaszkiewicz, A. W., Pyziel, A. M., & Dolka, I. (2014). Prevalence of *Dirofilaria repens* in dogs in central-eastern Poland and histopathological changes caused by this infection. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 58(1), 35–39.

Paulos, S., Mateo, M., de Lucio, A., Hernández-de Mingo, M., Bailo, B., Saugar, J. M., ... Carmena, D. (2016). Evaluation of five commercial methods for the extraction and purification of DNA from human faecal samples for downstream molecular detection of the enteric protozoan parasites *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Entamoeba* spp. *Journal of Microbiological Methods*, 127, 68–73.

Rishniw, M., Barr, S. C., Simpson, K. W., Frongillo, M. F., Franz, M., & Dominguez Alpizar, J. L. (2006). Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. *Veterinary Parasitology*, 135(3–4), 303–14.

Saah, A. J., & Hoover, D. R. (1997). “Sensitivity” and “specificity” reconsidered: The meaning of these terms in analytical and diagnostic settings. *Annals of Internal Medicine*, 126(1), 91–94.

Schuurman, T., Van Breda, A., De Boer, R., Kooistra-Smid, M., Beld, M., Savelkoul, P., & Boom, R. (2005). Reduced PCR sensitivity due to impaired DNA recovery with the MagNA pure LC total nucleic acid isolation kit. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(9), 4616–4622.

Wesolowska, M., Kisza, K., Szalinski, M., Zielinski, M., Okulewicz, A., Misiuk-Hojlo, M., & Szostakowska, B. (2010). First case of heterochthonous subconjunctival dirofilariasis described in Poland. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(2), 210.

Zarlenga, D. S., & Dame, J. B. (1992). The identification and characterization of a break within the large subunit ribosomal RNA of *Trichinella spiralis*: comparison of gap sequences within the genus. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 51(2), 281–9.

Zarlenga, D. S., Aschenbrenner, R. A., & Lichtenfels, J. R. (1996). Variations in microsatellite sequences provide evidence for population differences and multiple ribosomal gene repeats within *Trichinella pseudospiralis*. *The Journal of Parasitology*, 82(4), 534–8.

Zarlenga, D. S., Chute, M. B., Martin, a, & Kapel, C. M. (1999). A multiplex PCR for unequivocal differentiation of all encapsulated and non-encapsulated genotypes of *Trichinella*. *International Journal for Parasitology*, 29(11), 1859–67.

Zarnowska-Prymek, H., Cielecka, D., & Salamatin, R. (2008). [Dirofilariasis--*Dirofilaria repens*--first time described in Polish patients]. *Przegląd Epidemiologiczny*, 62(3), 547–51.

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2000). A Greedy Algorithm for Aligning DNA Sequences. *Journal of Computational Biology*, 7(1–2), 203–214.

Aleksander Masny
27.06.2017

Aleksander Masny