

Streszczenie Rozprawy Doktorskiej

mgr Kinga Leśniańska

SZOP PRACZ (*PROCYON LOTOR*, L) - INTRODUKOWANY I INWAZYJNY GATUNEK JAKO POTENCJALNY REZERWUAR ZOONOTYCZNYCH MIKROPASOŻYTÓW JELITOWYCH

Pomimo ciągłego wzrostu zainteresowania, wiedza na temat występowania pasożytów u gatunków obcych i inwazyjnych w faunie Europy pozostaje niewystarczająca. Szop pracz (*Procyon lotor*) stanowiący gatunek rodzimy fauny północnoamerykańskiej, introdukowany do Europy w XX wieku, nie został dotychczas dostatecznie przebadany pod kątem obecności kosmopolitycznych oportunistycznych mikropasożytów jelitowych, w tym *Enterocytozoon bieneusi* oraz z rodzajów *Encephalitozoon* i *Cryptosporidium*, identyfikowanych coraz częściej u człowieka i zwierząt domowych.

Celem niniejszej pracy była weryfikacja hipotezy, czy szop pracz pełni rolę rezerwuaru potencjalnie zoonotycznych ww mikropasożytów jelitowych. Ponadto, w celu oszacowania ryzyka dwukierunkowej transmisji mikropasożytów występujących u szopa i innych gatunków drapieżników współwystępujących z nim na badanym terenie, do puli badawczej włączono materiał pozyskany od ssaków rodzimych – lisa rudego (*Vulpes vulpes*), borsuka europejskiego (*Meles meles*), kuny leśnej i domowej (*Martes martes*, *Martes foina*) oraz innego gatunku obcego – jenota azjatyckiego (*Nyctereutes procyonides*).

W czasie trwania badań (w latach 2016-2019) do analizy wykorzystano materiał badawczy pozyskany od 389 osobników ssaków drapieżnych z 7 miejsc badawczych zlokalizowanych na terenie 3 sąsiadujących krajów – Polski, Niemiec i Czech. Próbki kału pobierano bezpośrednio z prostnicy zwierząt podczas sekcji parazytologicznych, a następnie wykorzystywano do izolacji DNA i amplifikacji przy użyciu metody nested-PCR. W celu detekcji a następnie identyfikacji *Cryptosporidium* spp., jako markery molekularne zastosowane zostały fragmenty następujących genów: COWP, 18S rRNA i aktyny. Z kolei w celu identyfikacji *Enterocytozoon bieneusi* i *Encephalitozoon* spp. wykorzystano gen kodujący region ITS rRNA. Po sekwencjonowaniu wybranych próbek pozytywnych, do

analizy filogenetycznej i statystycznej otrzymanych sekwencji użyto narzędzi bioinformatycznych, np. BLAST, MEGA 7.0 i STATISTICA 12.

W wyniku kompleksowych badań molekularnych potwierdzono obecność wszystkich poszukiwanych grup mikropasożytów. Spośród badanych drapieżników najwyższą ogólną prevalencję mikropasożytów zanotowano u szopa (54,4%), podczas gdy najniższą u lisa (36%). Ekstensywność zarażenia badanymi pasożytami u jenota i kuny wynosiła odpowiednio 54% i 48,5%. Ogólna prevalencja *Cryptosporidium* spp., wyznaczona wyniosła 30,2%. Ogólna prevalencja mikrosporydiów u badanych gatunków drapieżnych wyniosła odpowiednio 24,8% dla *E. bieneusi* oraz 7,8% dla *Encephalitozoon* spp.

Przeprowadzono również analizę dotyczącą występowania koinwazji u badanych drapieżników. Współwystępowanie 2 gatunków/rodzajów mikropasożytów stwierdzono u 43 przebadanych osobników z wszystkich badanych gatunków drapieżników (11,6%). U większości drapieżników była to koinwazja *Cryptosporidium* spp. i *E. bieneusi* (27,8%), z kolei u 10 osobników stwierdzono współwystępowanie pasożytów z rodzajów *Cryptosporidium* i *Encephalitozoon* (2,7%) oraz u 2 obecność mikrosporydiów *E. bieneusi* i *Encephalitozoon* spp. (0,5%). Zaledwie u 0,5% przebadanych zwierząt stwierdzono koinwazję wszystkimi trzema mikropasożytami.

Jednym z rezultatów niniejszych badań było pierwsze doniesienie o obecności *Cryptosporidium* genotypu skunksa u szopów w Europie. Genotyp ten stwierdzono również u rodzimego borsuka europejskiego, co sugeruje możliwość nabywania genotypów obcych, „zawleczonych” podczas kolonizowania nowych terenów przez gatunki obce.

Drugim najczęściej występującym gatunkiem *Cryptosporidium* był *C. canis* – odpowiednio genotyp psi u jenota i genotyp lisi u lisa. Ponadto opisano u nich obecność gatunków i genotypów specyficznych dla innych grup zwierząt, co może wynikać ze specyfiki diety drapieżników – były to *C. suis*, *C. erinacei*, *Cryptosporidium* spp. genotyp nornika MK-2018a oraz *Cryptosporidium* spp. genotyp nornika II.

Najczęściej identyfikowanym podczas badań genotypem *E. bieneusi* był genotyp NCF2 (syn. NCF3, WildBoar3). Po raz pierwszy zidentyfikowano go u szopów. Obecny był także u jenotów, lisów i kun. *E. bieneusi* genotyp NCF2 dotychczas był notowany u lisów i jenotów hodowanych w Chinach. Ponadto u szopów dokonano detekcji genotypu D, u lisów C i D, u borsuków EbCar2, u kun typu IV. Wszystkie z wyżej wymienionych, w wyniku analizy filogenetycznej zostały zaklasyfikowane do Grupy 1, zawierającej ponad 94% zoonotycznych i potencjalnie zoonotycznych genotypów *E. bieneusi* występujących zarówno u zwierząt dziko żyjących i hodowlanych, jak i u ludzi.

Pierwszy raz stwierdzono u szopa obecność mikrosporydiów z rodzaju *Encephalitozoon*. W wyniku analizy molekularnej określono, że mamy styczność z genotypem zbliżonym pod względem genetycznym do *E. pogonae*, który wykryto u gadów, co najprawdopodobniej związane jest z dietą drapieżników. Analogicznie, obecność u jenotów *C. suis*, u lisów *C. erinacei* oraz *C. ditrichi* u kun oraz genotypów *Cryptosporidium* spp. specyficznych dla gryzoni u kilku gatunków drapieżników, może wynikać ze zróżnicowanej diety wymienionych zwierząt i świadczyć o biernym pasażowaniu oocyst przez przewód pokarmowy, a nie o faktycznej inwazji nabłonka jelit żywicieli.

Uzyskane wyniki potwierdziły więc słuszność hipotezy badawczej zakładającej, że szop pracz, jako gatunek inwazyjny, pełni rolę rezerwuaru potencjalnie zoonotycznych mikropasożytów jelitowych. Ponadto, obecność nowych genotypów u kilku gatunków żywicielskich sugeruje prawdopodobieństwo transmisji nowych pasożytów na lokalną faunę oraz szansę powstawania nowych rezerwuarów dla patogenów, które były już wcześniej notowane na skolonizowanym przez nie terenie.

Słowa kluczowe: drapieżniki, mikropasożyty, kryptosporidia, mikrosporidia, PCR

Abstract

mgr Kinga Leśnińska

Raccoon (*Procyon lotor*, L) – introduced and invasive species as potential reservoir of zoonotic intestinal microparasites

Despite the extensive research on molecular epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Enterocytozoon bieneusi*, its prevalence and genetic diversity and the role of wild living hosts in zoonotic transmission of these microparasites are still poorly understood. The raccoon (*Procyon lotor*) represents the alien invasive species, native in North American fauna, introduced to Europe in the twentieth century. So far this species was not investigated for the prevalence and genotype identification of *Cryptosporidium* spp., *E. bieneusi* and *Encephalitozoon* spp.

The aim of this study was to identify intestinal microparasites present in wild living carnivores, both alien and native, occupying the same study area. Herein, we investigated fecal samples from the following species: raccoon (*Procyon lotor*), red fox (*Vulpes vulpes*), European badger (*Meles meles*), pine and stone marten (*Martes martes*, *Martes foina*) and raccoon dog (*Nyctereutes procyonides*).

During the research (conducted between 2016 and 2019), the material was obtained from 389 wild living predatory mammals from 7 research sites located in 3 neighboring countries - Poland, Germany and Czech Republic and then was used for the molecular analyses, ie. DNA isolation and PCR. Molecular markers selected for *Cryptosporidium* spp. detection, and identification were as following: COWP, 18S rRNA and actin genes. For *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon* spp. identification ITS region of rRNA gene was used for amplification. Selected positive samples were sequenced and used for phylogenetic and statistical analysis with bioinformatical tools (i.e. BLAST, MEGA 7.0 and STATISTICA 12).

Among all studied predators species, the highest overall prevalence of microparasites was found in the raccoon (54.4%), and the lowest in the fox (36%). The prevalence of the studied parasites in raccoon dog and marten was 54% and 48.5%, respectively. The overall prevalence of *Cryptosporidium* spp. was determined as 30.2%. The overall prevalence of microsporidia in the studied species of wild living mammals was 24.8% for *E. bieneusi* and 7.8% for *Encephalitozoon* spp.

The analysis also revealed the occurrence of co-infections, which were considered as the presence of more than one microparasite species. Co-occurrence of 2 species of parasites was found overall in 43 specimens from all predatory species (11.6%). In most cases, it was the co-occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *E. bieneusi* (7.8%), while in 10 individuals the coexistence of *Cryptosporidium* spp. and *Encephalitozoon* spp. (2.7%) was recorded. There were also 2 cases of co-occurrence of *E. bieneusi* and *Encephalitozoon* spp. (0.5%). Only in 0.5% of the examined animals co-infection with all three microparasites was noted.

The result of this study was the first report on the presence of the *Cryptosporidium* skunk genotype in raccoons in Europe. For the first time, the genotypes NCF2 *E. bieneusi*, which was previously identified in foxes and raccoon dogs bred in China, were found in wild living raccoons. Above mentioned genotype and other genotypes detected in this research, as a result of phylogenetic analysis, were classified in group 1, containing over 94% of zoonotic and potentially zoonotic *E. bieneusi* genotypes occurring both in wild and farmed animals as well as in humans.

The second most common species of *Cryptosporidium* was *C. canis* - the dog genotype in the raccoon dog population and the fox genotype in fox population respectively. In addition, the study describes the presence of some species and genotypes specific to other groups of animals, which may result from the specificity of the diet of predators – i.e. *C. suis*, *C. erinacei*, *Cryptosporidium* spp. vole genotype MK-2018a and *Cryptosporidium* spp. vole II genotype.

The presence of *Encephalitozoon* sp. was found for the first time in raccoon. As a result of molecular analysis, it has been determined as genotype with close genetic identity to *E. pogonae*, which was detected in reptiles. This finding is most probably associated with the diet of predators. Identification of some other species, like *C. ditrichi* or above mentioned *Cryptosporidium* vole genotypes (specific for rodents) in wild living predators seems to be confusing because it isn't known whether these species actually colonize the intestines or whether their oocytes or spores are only passively passaged through the digestive tract, without negative effect to host organism.

In European badger population were identified: *C. skunk* genotype, *C. erinacei*, *E. bieneusi* EbCar2 genotype and *Encephalitozoon* spp. Similarly in beech and stone marten were found *C. ditrichi*, *E. bieneusi* NCF2 genotype and also *Encephalitozoon* spp.

The obtained results clearly confirmed of a research hypothesis assuming that the raccoon, as an invasive species, plays the role of a reservoir of potentially zoonotic intestinal microparasites from the group of crypto- and microsporidia. In addition, the presence of some

new genotypes in introduced areas, in several host species, suggests the probability of transmitting new parasites to the local fauna and the chance to establish new reservoirs for pathogens that have previously been noted on the colonized territory.

The wide range of raccoons, raccoon dogs, red foxes or martens with their increasing populations in urban and peri-urban settlements, may led to spillover of overmentioned pathogens to domestic and companion animals as well as to humans.

Keywords: wild Canidae, *Cryptosporidium* spp., *Enterocytozoon bieneusi*, zoonotic potential, PCR