

## **Załącznik 2A**

Autoreferat w języku polskim

**dr Joanna Hildebrand**

Zakład Parazytologii  
Instytut Genetyki i Mikrobiologii  
Uniwersytet Wrocławski

**Imię i Nazwisko**

Joanna Małgorzata Hildebrand

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

2008 – uzyskanie stopnia doktora nauk biologicznych w zakresie biologii, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski

Tytuł pracy: „Struktura helmintofauny dziko żyjących gryzoni (Rodentia) ze zróżnicowanych środowisk miasta Wrocławia”. Praca wykonana w Zakładzie Parazytologii UWr, promotor prof. Anna Okulewicz

1994 – uzyskanie tytułu magistra biologii, specjalność biologia ogólna, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Wrocławski

Tytuł pracy: „Drobne ssaki w pokarmie sowy płomykówki z terenu województwa wrocławskiego”. Praca wykonana w Zakładzie Anatomii Porównawczej Kręgowców UWr, opiekun dr Franciszek Indyk

**Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

październik 2008 – do chwili obecnej - Zakład Parazytologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski; adiunkt (etat naukowo-dydaktyczny)

październik 2007 – wrzesień 2008 - Zakład Parazytologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski; asystent (etat naukowo-dydaktyczny)

czerwiec 2004 – wrzesień 2007 - Zakład Parazytologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski; specjalista (etat inżynieryjno-techniczny);

październik 1996 – maj 2004 - Zakład Parazytologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski; samodzielny biolog (etat inżynieryjno-techniczny);

wrzesień 1994 – sierpień 1996 - XX Liceum Ogólnokształcące, Zespół Szkół Łączności we Wrocławiu; nauczyciel biologii i ochrony środowiska

**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. 2017 r. poz. 1789)****Tytuł osiągnięcia naukowego**

***Relacje filogenetyczne w obrębie rodziny Dicrocoeliidae (Platyhelminthes, Digenea) - nowe spojrzenie w świetle danych molekularnych***

**Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia**

**P1. Hildebrand J.,** Pulis E.E., Tkach V.V. 2015. Redescription and phylogenetic relationships of the rare *Lyperosomum sarothrurae* Baer, 1959 (Digenea: Dicrocoeliidae). *Acta Parasitologica*, 60(3): 371-377

[IF 1.293, MNiSW 20]

**P2. Hildebrand J.,** Adamczyk M., Laskowski Z., Zaleśny G. 2015. Host-dependent morphology of *Isthmiophora melis* (Schrank, 1788) Luhe, 1909 (Digenea, Echinostomatinae) – morphological variation vs. molecular stability. *Parasites & Vectors*, 8: 481 (1-8)

[IF 3.232, MNiSW 35]

**P3. Hildebrand J.,** Sitko J., Zaleśny G., Jeżewski W., Laskowski Z. 2016. Molecular characteristics of representatives of the genus *Brachylecithum* Shtrom, 1940 (Digenea, Dicrocoeliidae) with comments on life cycle and host specificity. *Parasitology Research*, 115(4): 1417–1425

[IF 2.329, MNiSW 30]

**P4.** Tkach V.V., Achatz T.J., **Hildebrand J.,** Greiman S.E. 2018. Convolved history and confusing morphology: Molecular phylogenetic analysis of dicrocoeliids reveals true systematic position of the Anenterotrematidae Yamaguti, 1958 (Platyhelminthes, Digenea). *Parasitology International*, 67: 501–508

[IF 2.055, MNiSW 25]

**P5. Hildebrand J.,** Tkach V.V. 2019. Description and phylogenetic relationships of *Pojmanskatrema balcanica* n. gen., n. sp. (Digenea: Dicrocoeliidae) from the Eurasian water shrew *Neomys fodiens* (Mammalia: Soricidae) in Bulgaria. *Acta Parasitologica*, (1-6), doi.org/10.2478/s11686-019-00038-8

[IF 1.039, MNiSW 20]

**P6. Hildebrand J.,** Pyrka E., Sitko J., Jeżewski W., Zaleśny G., Tkach V.V., Laskowski Z. 2019. Molecular phylogeny provides new insights on the taxonomy and composition of *Lyperosomum* Looss, 1899 (Digenea, Dicrocoeliidae) and related genera. *International Journal for Parasitology: Parasite and Wildlife*, 9: 90-99, doi.org/10.1016/j.ijppaw.2019.03.020

[IF 2.777, MNiSW 40]

Sumaryczny IF publikacji stanowiących osiągnięcie zgodny z rokiem opublikowania wynosi **12,725**. Suma punktów za ww. publikacje zgodnie z wykazem MNiSW wynosi **170**.

## **Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

### *Uzasadnienie podjęcia badań*

Przyczynkiem do podjęcia przeze mnie rozważań nad relacjami taksonomicznymi w obrębie przywr digenicznych były wyniki badań nad występowaniem tej grupy helmintów w populacjach dziko żyjących gryzoni. Część z nich była przedmiotem mojej pracy doktorskiej, część dotyczącą trudności w identyfikacji taksonomicznej przywr w kontekście zmienności fenotypowej oraz specyficzności żywicielskiej i siedliskowej, kontynuowałam po jej obronie. W trakcie kilkuletnich badań nad helmintofauną dziko żyjących gryzoni na terenie Dolnego Śląska, zainicjowanych przeze mnie i prowadzonych w Zakładzie Parazytologii Uniwersytetu Wrocławskiego, pozyskano przywry z rodzaju *Brachylecithum* (Dicrocoeliidae), które zakwalifikowano do nowego gatunku *B. glareoli* Hildebrand, Okulewicz et Popiołek, 2007 (Hildebrand i wsp. 2007). Zostały one wyizolowane z przewodów żółciowych nornic rudych *Myodes glareolus* odławianych na terenie pól wodonośnych Wrocławia. Rodzaj *Brachylecithum* grupuje gatunki pasożytujące głównie u ptaków, *B. glareoli* był trzecim gatunkiem z tego rodzaju stwierdzonym u gryzoni na terenie Europy. Do rozpoczęcia badań molekularnych z wykorzystaniem zróżnicowanych markerów i podjęcia próby wyjaśnienia powiązań filogenetycznych w obrębie rodziny Dicrocoeliidae skłoniła mnie historia powstawania systemu klasyfikacji w tej grupie przywr, tj. likwidowanie i tworzenie kolejnych rodzajów, wielokrotne przenoszenie gatunków z rodzaju do rodzaju, próby dołączenia cech biologicznych do klasyfikacji opartej na cechach morfometrycznych (Panin 1984, Pojmańska 2008). Dodatkowym czynnikiem, który przyczynił się do podjęcia badań była liczba opisanych gatunków (ponad 400), która jest w dużej mierze wynikiem przekonania o wąskiej specyficzności żywicielskiej przedstawicieli tej rodziny, przy jednoczesnym braku danych molekularnych pozwalających na wyjaśnienie pokrewieństw pomiędzy taksonami.

### *Wprowadzenie*

Rodzina Dicrocoeliidae Looss, 1899 (Digenea, Plagiorchiida, Xiphidiata, Gorgoderoidea) obejmuje 47 rodzajów przywr zgrupowanych zgodnie z ostatnim systemem klasyfikacji w trzech podrodzinach: Dicrocoeliinae, Leipertrematinae, Prosolecithinae, których rozwój

zachodzi wyłącznie w środowisku lądowym (Pojmańska 2008). Żywicielami ostatecznymi Dicrocoeliidae są ptaki i ssaki, rzadziej gady. Do typowych miejsc pasożytowania należą przewody żółciowe i pęcherzyk żółciowy, sporadycznie trzustka i jelito (Panin 1984; Pojmańska 2008). W cyklu życiowym występuje dwóch żywicieli pośrednich, pierwszym są ślimaki, głównie z podgromady Pulmonata, u których rozwijają się *xiphidiocercariae*, zaopatrzone w długi lub zredukowany ogonek; rolę drugiego żywiciela pośredniego pełnią stawonogi, przede wszystkim owady. W cyklu życiowym może dodatkowo występować trzeci żywiciel pośredni lub żywiciel parateniczny, przy czym wiedza na temat pełnych cykli życiowych poszczególnych gatunków jest wciąż bardzo uboga (Panin 1984; Pojmańska 2008). Zgodnie z dostępną literaturą cykle życiowe znane są dla 15 gatunków należących do Dicrocoeliidae, przy czym zdecydowana większość z nich została opisana na podstawie zarażeń eksperymentalnych (Denton 1945; Timon-David 1957, 1960; Kingston 1965; Carney 1970; Romanerio 1978; Krissinger 1984).

Systematyka rodziny Dicrocoeliidae ma bogatą i skomplikowaną historię co jest wynikiem trudności w skonstruowaniu przejrzystego systemu klasyfikacji (Pojmańska 2008). Na przestrzeni kilkudziesięciu lat pojawiały się kolejne propozycje dotyczące podziałów systematycznych w obrębie tej grupy, które różniły się, często znacznie, składem taksonów wyodrębnianych na różnych szczeblach taksonomicznych. Do prac, które sukcesywnie zmieniały system klasyfikacji rodziny należą opracowania Shtrom'a (1940), Trvassos'a (1944), Skrjabina i Evranovej (1952), Yamaguti'ego (1958, 1971), Panina (1984). Przykładami taksonów o szczególnie niestabilnej pozycji są rodzaje *Brachylecithum* i *Lyperosomum*, które to były przedmiotem przeprowadzonych przeze mnie analiz molekularnych prezentowanych w publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego (**P1, P3, P5, P6**).

Propozycje klasyfikacji w rodzinie Dicrocoeliidae były oparte przede wszystkim na porównywaniu cech morfologicznych dorosłych osobników. Jednocześnie liczne redyskrypcje wskazują na trudności ze znalezieniem cech różnicujących taksony różnych szczebli przy użyciu wyłącznie cech morfometrycznych. Trudności te wynikają z kilku aspektów. Jest to grupa reprezentująca bardzo dużą zmienność cech morfologicznych takich jak kształt ciała, ale także wielkości i położenie organów wewnętrznych. Dodatkowo niektóre cechy morfologiczne, takie jak położenie wzajemne jąder oraz ich położenie w odniesieniu do przyssawki czy wielkość jajnika w odniesieniu do jąder, u niektórych grup stanowią cechę taksonomiczną na poziomie rodzaju a u innych są wynikiem wewnątrzgatunkowej zmienności (Macko i Mackova 1995). Na kwestie zmienności wewnątrzgatunkowej wybranych gatunków zwracało uwagę kilku autorów (Mettrick 1963; Odening 1964; Sitko 1994; Macko i Mackova 1995; Sitko 1995; Kostadinova 1996; Sitko i wsp. 2000; Sitko i Okulewicz 2002; Hildebrand

i wsp. 2007). Dodatkowo, przywry te żyją stosunkowo długo, wykazują raczej powolny wzrost, a podczas wzrostu i dojrzewania wykazują spore zmiany wielkości i proporcji ciała oraz położenia gonad (Sitko 1995; Hildebrand i wsp. 2007). Należy również zwrócić uwagę na specyficzne siedlisko w jakim przywry te bytują, woreczek żółciowy, a w szczególności przewody żółciowe nie należą do „gościnnych” mikrohabitatów (ograniczona przestrzeń, wpływ związków chemicznych), co w połączeniu z intensywną inwazją (efekt przegęszczenia „crowding effect”) może znacząco wpływać na zmienność fenotypową tych przywr (Tkach i Bray 1995; Pinto i wsp. 2015).

Do obserwowanego bogactwa opisanych gatunków w obrębie Dicrocoeliidae przyczyniła się także specyficzność żywicielska, a właściwie długoletnie przekonanie parazytologów o jej wąskim charakterze. Specyficzność pasożytów jest jedną z ważniejszych i biologicznie ciekawszych cech pasożytnictwa, gdyż mówi o zdolności organizmu pasożytniczego do adaptacji do określonych gatunków pełniących rolę żywicieli, jednakże jej charakter, jak i czynniki ją warunkujące wciąż pozostają w kręgu badań.

W obecnej dobie obserwuje się intensywny rozwój badań taksonomicznych a przede wszystkim filogenetycznych z wykorzystaniem technik biologii molekularnej. Przy czym aktualnie do identyfikacji gatunków, oceny bioróżnorodności czy badania pokrewieństw na poziomie populacji, rodziny lub taksonów wyższych używane są różne markery reprezentujące różne tempo ewolucji. Badania nad molekularną filogenezą przywr digenicznych i wykorzystaniem wybranych markerów molekularnych rozpoczęły się w zasadzie na początku XXI w. (Littlewood i Olson 2001; Olson i wsp. 2003; Tkach i wsp. 2001, 2003), jednakże rodzina Dicrocoeliidae pozostawała w dużej mierze poza kręgiem tych zainteresowań. Badania molekularne w obrębie Dicrocoeliidae do roku 2015 prowadzone były tylko na kilku gatunkach, przy czym najczęstszym obiektem analiz było *Dicrocoelium dendriticum* i inni przedstawiciele tego rodzaju, z uwagi na aspekt weterynaryjny i epidemiologiczny. Kiedy po uzyskaniu grantu KBN (nr N303580939) rozpoczynałam badania nad molekularną weryfikacją przedstawicieli rodzaju *Brachylecithum* (lata 2010-2013), w bazie GenBank umieszczonych było łącznie 205 sekwencji, przy czym 190 to sekwencje *Dicrocoelium* spp. Pozostałe sekwencje (15) pochodziły z trzech prac i dotyczyły fragmentów genów 18S i 28S rRNA *Brachylecithum lobatum* i *Lyperosomum collurionis*, wykorzystanych w analizie filogenetycznej Digenea, przeprowadzonej z uwzględnieniem 163 przedstawicieli podgromady (Olson i wsp. 2003). Pozostałe to sekwencje *Brachylecithum mosquensis* z osobników wyizolowanych zarówno z typowego dla tej przywry żywiciela jakim jest *Turdus migratorius* jaki i ryjówki *Sorex vagrans*, u której ten pasożyt został stwierdzony po raz pierwszy (Kinsella i Tkach 2009). Poza tym w bazie znajdowały się sekwencje 18S rRNA *Concinnum ten*, *Corrigia vita*, *Eurytrema*

*coelmaticum*, *E. pancreaticum* i nowo opisanego gatunku *Paraconcinnum leirsi* (Ribas i wsp. 2012). Była to więc grupa przywr bardzo słabo molekularnie scharakteryzowana, szczególnie w odniesieniu do bogactwa gatunkowego wykazywanego na podstawie cech morfologicznych i specyficzności żywicielskiej.

### *Cel badań*

Celem podjętych przeze mnie badań było molekularne scharakteryzowanie wybranych przedstawicieli rodziny Dicrocoeliidae co pozwoliłyby na weryfikację powiązań taksonomicznych i przeprowadzenie analizy pokrewieństw filogenetycznych w obrębie rodziny. Kolejne etapy badań obejmowały:

- [1] pozyskanie i morfologiczną analizę materiału helmintologicznego;
- [2] uzyskanie swoistych sekwencji nukleotydowych przedstawicieli wybranych gatunków; w pierwszym etapie badań były to głównie gatunki z rodzajów *Brachylecithum*, *Lutztrema* i *Lyperosomum* występujące w Europie; w kolejnym, przywry pozyskane na innych kontynentach, tj. w Afryce, gdzie zimują europejskie populacje niektórych gatunków ptaków, a także z rejonów, których pierwotnie pewne rodzaje były opisane (*Zonorchis* /Ameryka Środkowa i Południowa);
- [3] molekularną weryfikację statusu taksonomicznego analizowanych gatunków;
- [4] odniesienie się do specyficzności żywicielskiej przedstawicieli rodzaju *Brachylecithum* i *Lyperosomum* występujących w Europie;
- [5] wykorzystanie otrzymanych sekwencji nukleotydowych do identyfikacji przynależności rodzajowej / gatunkowej form larwalnych izolowanych z żywicieli pośrednich (oznaczanych do tej pory wyłącznie w oparciu o cechy morfometryczne);
- [6] przeprowadzenie analizy pokrewieństw z wykorzystaniem uzyskanych sekwencji oraz sekwencji dostępnych w bazie GenBank;
- [7] w oparciu o wyniki powyższych analiz zweryfikowanie przydatności cech morfologicznych do identyfikacji przedstawicieli Dicrocoeliidae.

Planowanym końcowym efektem moich badań jest zaproponowanie naturalnego systemu klasyfikacji taksonów skupionych w obrębie rodziny Dicrocoeliidae.

### *Metodyka badań*

Materiał stanowiły przywry zgromadzone na potrzeby badań nad helmintofauną kręgowców, prowadzonych w Zakładzie Parazytologii Uniwersytetu Wrocławskiego oraz okazy otrzymane dzięki współpracy z RNDr Jilji Sitko z Moravian Ornithological Station Comenius Museum w Prerov'ie (Czechy). Dr J. Sitko w trakcie wieloletnich badań nad helmintofauną

ptaków, głównie Czeskich Moraw, stworzył bogatą i unikatową w skali europejskiej, kolekcję pasożytniczych robaków, w tym przywr digenicznych (Sitko i wsp. 2006). Współpracę naukową nawiązałam również z prof. Vasylem Tkachem z University of North Dakota (Grand Forks, USA), który z uwagi na realizację licznych projektów badawczych na terenie Afryki, Azji, Ameryki Północnej, Środkowej i Południowej oraz Europy, zgromadził cenny zbiór przywr pasożytujących u ptaków, ssaków i gadów. W trakcie stażu realizowanego na Uniwersytecie w Dakocie Północnej otrzymałam kilkadziesiąt sekwencji przywr reprezentujących różne taksony z kręgu Dicrocoeliidae, pochodzących z różnych rejonów geograficznych. Równoległe z badaniami molekularnymi prowadziłam analizę cech morfologicznych powyższych okazów.

Ponadto, w trakcie realizacji projektu pt. „Helmintofauna ślimaków nagich jako potencjalne zagrożenie dla człowieka i zwierząt domowych” (grant nr N303499938, Instytut Parazytologii PAN), w którym pełniłam rolę głównego wykonawcy, pozyskaliśmy formy larwalne przywr ze ślimaków nagich oraz skorupowych, a także z równonogów (Crustacea: Isopoda), które po wstępnej analizie zakwalifikowaliśmy do Dicrocoeliidae.

W analizach wykorzystano dwie grupy markerów molekularnych: [1] fragment genu dużej podjednostki rybosomalnej (28S rDNA) obejmujący domeny D1-D3 o długości 1200-1400 pz oraz [2] fragmenty genów mitochondrialnych, tj. genu kodującego podjednostkę 1 oksydazy cytochromowej (*cox1* mtDNA) oraz genu kodującego podjednostkę 1 dehydrogenazę dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (*nad1* mtDNA), o długości ok. 400 pz i 500 pz odpowiednio. Powyższe markery posłużyły do przeprowadzenia charakterystyki molekularnej i weryfikacji taksonomicznej wybranych gatunków oraz wykonania analiz pokrewieństwa filogenetycznego. Startery użyte w reakcjach PCR zostały wybrane w oparciu o literaturę lub zaprojektowane na potrzeby niniejszych badań (**P3, P4, P6**). Do stwierdzenia poprawności sekwencji i tworzenia uzgodnionych kontigów wykorzystano program DNA Baser i Sequencher™, do przyrównania złożonych sekwencji wraz z sekwencjami z GenBank używano narzędzia ClustalW zaimplementowanego w programach MEGA i BioEdit. Sekwencje były uzgadniane z kilku odczytów lub z kilku izolatów, jeśli było to tylko możliwe. Wielokrotność powtórzeń, szczególnie w początkowym etapie badań, wynikała także z braku dostępnych sekwencji gatunków z badanej grupy a tym samym możliwości ich weryfikacji. Analizy filogenetyczne zostały wykonane bayesowską metodą rekonstrukcji filogenezy w programie MrBayes (**P1, P3, P4, P5, P6**), po uprzednim, każdorazowym dla danej puli analizowanych sekwencji, wyborze najlepszego modelu ewolucji, tj. modelu substytucji nukleotydowych oraz rozkładu tempa podstawień, przy użyciu oprogramowania JModelTest.



### Opis osiągnięcia

Weryfikacja relacji taksonomicznych w obrębie Dicrocoeliidae prowadzona była przede mną dwutorowo. Równolegle do badań molekularnych (izolacja DNA, PCR, uzyskanie i analiza sekwencji) prowadziłam analizę cech morfologicznych, zarówno na podstawie literatury (Skrjabin i Evranova 1952; Panin 1984; Pojmańska 2008; oryginalne opisy gatunków) jak i obserwacji mikroskopowych wykonanych przez siebie preparatów (Zakład Parazytologii UW, Instytut Biologii UND, USA) oraz kolekcji preparatów zdeponowanych w Muzeum Komeńskiego (Prerov, Czechy). Analizy morfometryczne pozwoliły mi na wysunięcie wstępnej hipotezy o konieczności weryfikacji cech uznawanych w systemach klasyfikacji Dicrocoeliidae za kluczowe, między innymi takich jak położenie jąder (cecha determinująca przynależność do podrodziny), czy położenie żółtników i wzajemne położenie gonad lub położenie otworu płciowego. Trudności jakie napotkałam przy identyfikacji części okazów (**P1**, **P5**) w oparciu o obowiązujący klucz (Pojmańska 2008) wzmocniły przekonanie, że używane dotychczas w systemach klasyfikacji cechy morfologiczne, nie stanowią wiarygodnego kryterium dla wnioskowania o powiązaniach filogenetycznych w obrębie rodziny.

Analiza morfologiczna (Skrjabin 1970; Pojmańska 2008) przywr wyizolowanych z afrykańskiego ptaka *Sarothrura pulchra* przedstawiona w publikacji **P1** pozwoliła na identyfikację do gatunku *Lyperosomum sarothrurae* (drugie stwierdzenie występowania tego pasożyta w historii) oraz jego redyskrypcję z uwzględnieniem holotypu, a także poddała pod dyskusję zasadność istnienia rodzaju *Megacetabulum*. Praca ta nabiera szczególnego znaczenia, gdyż przedstawiona została w niej pierwsza analiza filogenetyczną przedstawicieli rodziny Dicrocoeliidae opartą na fragmencie genu 28S rRNA, markera aktualnie stosowanego w rekonstrukcjach filogenezy przywr digenicznych.

Wstępna diagnoza morfometryczna okazów pozyskanych z rzęsorka rzeczka *Neomys fodiens* sugerowała ich przynależność do rodzaju *Metadelphis*. Jednakże szczegółowe porównanie z gatunkami opisanymi wcześniej w tym rodzaju, jak i rodzajach pokrewnych nie potwierdzało tej diagnozy (**P5**). Pierwsze analizy molekularne wykonane z wykorzystaniem uzyskanych przeze mnie sekwencji, innych sekwencji własnych oraz zdeponowanych w bazie GenBank (wciąż wtedy nielicznych) lokowały te okazy w rodzaju *Lyperosomum*. Pozyskanie przez prof. V. Tkacha okazów przywr z nietoperzy występujących w Ameryce Środkowej i Południowej, ich analiza molekularna i morfologiczna pozwoliła nam na zmianę pozycji systematycznej rodziny Anenterotrematidae i włączenie jej do Dicrocoeliidae, przeprowadzenie redyskrypcji rodzaju *Parametadelphis* i *Metadelphis* oraz zaproponowanie nowej diagnozy tego ostatniego rodzaju jak i podrodziny Dicrocoeliinae (**P4**). Dalsze analizy rozszerzono o sekwencje uzyskane z przywr pasożytujących u ssaków tj. *Lyperosomum*

*intermedium* ze szczura ryżowego *Oryzomys palustris* i *Lutziella microacetabulare* z nietoperza *Hipposideros armiger* a także nowo zamieszczonych w bazie GenBank sekwencji *Eurytrema pancreaticum* (izolaty z owiec) i *Platynosomum illiciens* (izolaty z myszy domowej i marmozety). W tych pełniejszych analizach przywry z *Neomys fodiens* stworzyły kład o bardzo silnym wsparciu (100%) z *E. pancreaticum*. Wyniki te w połączeniu z przeprowadzoną przez mnie diagnozą morfologiczną skłoniły nas do ustanowienia nowego rodzaju – *Pojmanskatrema* n. gen. (**P5**).

Badania nad molekularną charakterystyką przedstawicieli *Brachylecithum* i *Lyperosomum* oraz relacjami na poziomie wewnątrzrodzajowym, poszerzyłam o przedstawicieli rodzajów *Brachydistomum* i *Lutztrema* oraz *Skrjabinus* i *Zonorchis*, wielokrotnie wyłączanych i przywracanych do rodziny przy okazji zmieniających się koncepcji na temat systematyki grupy. Zaobserwowana przeze mnie jak i wspomniana w literaturze zmienność wewnątrzgatunkowa, pozostawała w dysonansie z bogactwem gatunkowym wynikającym, przynajmniej częściowo, z utrwalonej przez lata wąskiej specyficzności żywicielskiej. Zgodnie z monografią Panina (1984) rodzaj *Brachylecithum* grupuje ponad 90, a *Lyperosomum* ponad 30 gatunków.

Do analizy specyficzności żywicielskiej przedstawicieli rodzaju *Brachylecithum* i *Lyperosomum*, występujących u europejskich ptaków, a także sporadycznie stwierdzanych u ssaków, wykorzystałam poza markerem jądrowym (28S rDNA) markery mitochondrialne, które w analizach filogenetycznych przywr z rodziny Dicrocoeliidae zostały użyte po raz pierwszy (**P3, P6**). Markery te były używane i testowane w równolegle prowadzonych badaniach nad zmiennością morfologiczną przywr *Istmiophora melis*, stwierdzonych u *Apodemus agrarius* na terenie Dolnego Śląska (**P2**). Wyniki analiz molekularnych fragmentów genów jądrowych (28S, ITS rDNA) i mitochondrialnych (*cox1*) w powiązaniu z przeprowadzaną analizą statystyczną danych morfometrycznych (analiza dyskryminacyjna) przywr z gatunku *I. melis* występujących u różnych żywicieli, w tym typowych jak borsuk oraz niespecyficznych – mysz polna, pokazały, że obserwowane, znaczące i istotne statystycznie różnice, są odzwierciedleniem zmienności wewnątrzgatunkowej, na którą decydujący wpływ ma gatunek żywiciela (**P2**). Diagnostyka morfologiczna okazów izolowanych z myszy polnej przeprowadzona na podstawie obowiązującego klucza nie pozwalała na jednoznaczną identyfikację taksonomiczną. Wartym podkreślenia jest fakt, że zaobserwowana zmienność dotyczyła cech (proporcji) uznawanych za diagnostyczne także na poziomie rodzaju (Kostadinowa 2002). Wyniki te miały podwójne znaczenie dla dalszych badań nad zmiennością przywr z rodzaju *Brachylecithum* i *Lyperosomum* oraz weryfikacją cech morfologicznych wskazywanych jako kluczowe w taksonomii Dicrocoeliidae. Markery mitochondrialne mogły

być przetestowane na znacznie bogatszym ilościowo materiale niż materiał z Dicrocoeliidae i zostały one wykorzystane do otrzymania wstępnych sekwencji, co pomogło w zaprojektowaniu specyficznych starterów użytych w pracach **P3** i **P6**. Praca **P2** pokazała, że plastyczność fenotypowa przywr jako wynik wpływu żywiciela może być znacząca, i może nie wpisywać się w obowiązujący system klasyfikacji.

Charakterystyka molekularna przedstawicieli *Brachylecithum* zaprezentowana w pracy **P3** była pozwoliła na przeprowadzenie i przedstawienie pierwszej analizy powiązań filogenetycznych w obrębie rodzaju należącego do Dicrocoeliidae i pokazała odrębność gatunków (*B. kakea* i *B. lanicola*) występujących u ptaków migrujących (*Acrocephalus arundinaceus*, *Lanius collurio*), u których te przywry stwierdzane są tylko w okresie wiosennym, od gatunków występujących u krukowatych (*B. lobatum*) i zamykających cykl życiowy na naszym terenie. Przedstawiony po raz pierwszy w niniejszej pracy cykl życiowy *B. lobatum* jest jednocześnie jednym z nielicznych cykli życiowych Dicrocoeliidae potwierdzonych w naturze, a ponadto jest pierwszym w historii stwierdzeniem skrócenia cyklu życiowego zaobserwowanym u przedstawicieli tej rodziny (sporocysty z cercariami i metacerkarie w tym samym osobniku ślimaka *Cepaea* sp.). Na tym etapie badań, mając na uwadze cechy biologiczne oraz interpretację danych molekularnych (łącznie analiza fragmentów genów 28S rRNA i *cox1* mtDNA) utrzymano odrębność gatunku *B. glareoli* pasożytującego u nornicy rudej (**P3**). W świetle ostatnich wyników (**P6**) *B. glareoli* należy uznać za podgatunek *B. lobatum*, którego specjacja prawdopodobnie się rozpoczęła się stosunkowo niedawno, do czego mogło się przyczynić się skrócenie cyklu życiowego.

Jednym z przykładów skomplikowanej taksonomii Dicrocoeliidae jest gatunek opisany jako *Dicrocoelium petiolatum* Railliet, 1900 i najpierw przeniesiony do rodzaju *Lyperosomum* przez Shtrom'a (1940), a następnie do rodzaju *Zonorchis* przez Travassos'a (1944) oraz Denton'a i Byrd'a (1951), po czym Dolfus (1954) zaproponował dla tego gatunku nowy rodzaj *Dicrocoelioides*. Panin (1984) ponownie umieścił ten takson w *Zonorchis*, a Pojmańska (2008) w ostatniej propozycji systemu klasyfikacji rodziny zsynonimizowała rodzaj *Zonorchis* z rodzajem *Skrjabinus*. W celu wyjaśnienia tych historycznych zawłości postanowiłam przeanalizować kwestie zmienności wewnątrzgatunkowej i specyficzności żywicielskiej *Zonorchis petiolatus* oraz gatunków morfologicznie podobnych, a także molekularnego pokrewieństwa z typowymi przedstawicielami rodzaju *Zonorchis* (okazy z Ameryki Południowej, Środkowej i Północnej) oraz *Skrjabinus* (*S. kalmikensis*). W wyniku przeprowadzonych badań molekularnych z wykorzystaniem wielu izolatów (łącznie 56 wykorzystanych do końcowej analizy) pozyskanych z dorosłych przywr oraz z postaci larwalnych (sporocysty, metacerkarie) przy użyciu markerów jądrowych i mitochondrialnych, stwierdziłam, że gatunkiem pospolicie

występującym na terenie Europy Środkowej jest *Lyperosomum petiolatum*, zarówno u Corvidae, z których był opisany, jak i u małych ptaków migrujących jak *Sylvia atricapilla*, *Emberiza schoeniclus*, *Motacilla alba*, *Prunella modularis*, *Alauda arvensis*. Interesującym wynikiem jest stwierdzenie odmienności molekularnej, wyraźnie widocznej w analizie łączonej (cox1, nad1), przywr występujących u Turdidae, które przez wiele lat identyfikowane były jako *Zonorchis petiolatus* (syn. *Lyperosomum petiolatum*).

Dzięki włączeniu do analiz przywr z rodzaju *Lyperosomum* zamykających cykl życiowy na terenie Europy oraz tych nabywanych przez ptaki podczas zimowisk poza Europą (głównie w Afryce), przedstawiciele afrykańskich gatunków *Lyperosomum*, a także przywr z rodzaju *Zonorchis*, możliwe było przywrócenie nazwy rodzajowej *Lyperosomum* dwóm gatunkom tj. *Z. petiolatus* i *Z. clathratus*, a także zdecydowane potwierdzenie hipotezy, że jedna z cech uznawanych za główną cechę dyskryminacyjną w taksonomii Dicrocoeliidae, czyli położenie wzajemne jąder, jest niewłaściwa. Wyniki analiz filogenetycznych zaprezentowanych w pracach **P4**, **P5**, **P6** pokazują, że gatunek o symetrycznym położeniu jąder jak *L. clathratus* jest blisko spokrewniony z *L. petiolatum* z jądrami położonym najczęściej ukośnie (znaczną zmienność wewnątrzgatunkowa tej cechy) oraz w kładzie z innymi przedstawicielami *Lyperosomum* o jądrami położonych jedno za drugim (*L. sarothrae*, przywry notowane u *Acrocephalus* sp. i *Delichon* sp.) jak i przedstawiciele *Zonorchis*, rodzaju utworzonego przez Travassosa (1944) dla przywr symetrycznych jądrami położonych blisko przysawki występujących w obu Amerykach. Jednocześnie w drugim dużym kładzie obok przywr z rodzaju *Brachylecithum* i *Luttrema* znalazły się przywry z rodzaju *Metadelphis*, posiadające zmienny układ jąder oraz *Lutziella microacetabulare* i *Stromitrema koshewnikowi*, które w ostatnim systemie klasyfikacji (Pojmańska 2008) zostały umieszczone w podrodzynie Leiptrematinae a nie Dicrocoeliinae, do której należą rodzaje *Brachylecithum*, *Dicrocoelium* czy *Luttrema*.

Odnosząc się do pokrewieństw filogenetycznych przedstawionych i przeanalizowanych w ostatnich publikacjach (**P4**, **P5**, **P6**) należy zwrócić uwagę na punkty wsparcia poniżej 75% w przypadku niektórych gałęzi prezentowanych drzew. Wartości te odnoszą się do części grup wewnętrznych w obrębie dużych kładów i ulegają zmianom w kolejnych analizach wraz z poszerzaniem puli danych. Wyniki te świadczą o tym, że relacje w obrębie Dicrocoeliidae nie są ostatecznie wyjaśnione. Ze względu na bogactwo taksonów opisanych w tej rodzinie potrzebne są dalsze badania, które dostarczą danych molekularnych o reprezentantach pozostałych rodzajów wchodzących w skład Dicrocoeliidae.

*Podsumowanie* kilkuletnich badań nad molekularną charakterystyką i filogenezą przywr z rodziny Dicrocoeliidae, których rezultaty stanowią prezentowane osiągnięcie:

[1] łącznie analizie poddałam ponad 200 sekwencji własnych otrzymanych z izolatów dorosłych przywr pasożytujących u różnych gatunków ptaków i ssaków oraz z form larwalnych (sporocysty z cercariami, metacerkarie), z czego w bazie GenBank zdeponowano 153 sekwencje nukleotydowe, co stanowi aktualnie 53% dostępnych sekwencji przywr z rodziny Dicrocoeliidae, z wyłączeniem *Dicrocoelium* spp. (**P1, P3, P4, P5, P6**);

[2] po raz pierwszy została wykonana analiza filogenetyczna przywr należących do Dicrocoeliidae oparta na sekwencjach 28S rDNA (**P1**), która sukcesywnie była poszerzana o kolejne gatunki i rodzaje (**P3, P4, P5, P6**) umożliwiając weryfikacje pokrewieństw w obrębie rodziny;

[3] po raz pierwszy zostało przedstawione wewnątrzrodzajowe molekularne zróżnicowanie taksonów innych niż *Dicrocoelium*, tj. *Brachylecithum* i *Lyperosomum* (**P3, P6**), jednocześnie analizy filogenetycznego pokazały ich parafiletyczny charakter; *Dicrocoelium* było jedynym charakteryzowanym molekularnie rodzajem z rodziny Dicrocoeliidae do czasu podjęcia przeze mnie badań;

[4] zaproponowano utworzenie nowego rodzaju w obrębie Dicrocoeliidae – *Pojmanskatrema* n.gen. (nazwa pochodzi od nazwiska profesor Teresy Pojmańskiej, w uznaniu Jej wkładu w badania parazytologiczne, w tym nad rodziną Dicrocoeliidae) jako wyniki kompilacji wyników molekularnych i diagnozy morfologicznej (**P5**);

[5] w wyniku przeprowadzonych analiz morfologicznych i molekularnych poddano taksonomicznej weryfikacji następujące gatunki: *Brachylecithum lobatum*, *Lyperosomum sarothrurae*, *L. alagesi*, *L. alaudae*, *L. collurionis*, *Zonorchis clathratus*, *Z. petiolatus*. Dodatkowo redyskrypcji poddano rodzaje: *Megaceatbulum*, *Metadelphis*, *Parametadelphis* oraz rodzinę Anenterotrematidae (**P1, P3, P4, P5, P6**);

[6] zweryfikowano użyteczność cech morfologicznych uznawanych za kluczowe w taksonomii Dicrocoeliidae, takich jak między innymi położenie jąder, cechy, która wskazywana była do różnicowania na poziomie podrodzin (**P4, P5, P6**);

[7] wyniki analiz filogenetycznych (niepotwierdzona monofiletyczność dwóch największych podrodzin: Dicrocoeliinae i Leipertrematinae) wraz z przeprowadzoną weryfikacją cech morfologicznych stały się podstawą do podjęcia decyzji o porzuceniu obecnego podziału rodziny Dicrocoeliidae na podrodziny (**P4, P6**);

[8] fragment genu mitochondrialnego *cox1* uznano jako dobry i polecany marker do badań taksonomicznych w obrębie Dicrocoeliidae (**P3**), w tym do analiz relacji między i wewnątrzgatunkowych (**P2, P3, P6**); jednocześnie, po raz pierwszy w tej grupie zastosowano marker mitochondrialny do analiz filogenetycznych (**P3**);

[9] wykazano przydatność fragmentu genu oksydazy cytochromowej do poszukiwania w środowisku naturalnym żywicieli pośrednich badanych przywr (**P3, P6**); w efekcie zidentyfikowano formy larwalne (sporocysty i metacerkarie) *Brachylecithum lobatum* w wstężyku gajowym i ogrodowym (**P3**) oraz sporocysty *Lyperosomum petiolatum* w ślimakach nagich a metacerkarie w równonogach (**P6**).

Tym samym, wyżej wymienione cykle zostały po raz pierwszy opisane ze środowiska naturalnego (zdecydowana większość z 14 opisanych cykli życiowych w rodzinie Dicrocoeliidae została zamknięta tylko w warunkach eksperymentalnych), a także po raz pierwszy u przedstawiciela Dicrocoeliidae wykazano możliwość zamknięcia cyklu życiowego przy udziale jednego żywiciela pośredniego (**P3**).

Moje najbliższe plany naukowe związane są z kontynuacją badań nad powiazaniami filogenetycznymi i taksonomicznymi pomiędzy taksonami w rodzinie Dicrocoeliidae, których końcowym efektem będzie próba stworzenia naturalnego systemu klasyfikacji tej grupy przywr digenicznych. Kolejna rodzina przywr jaką aktualnie się zajmuję przy współpracy z dr. Geradem Kanarkiem z Muzeum i Instytutu Zoologii PAN, to Strigeidae. Nasze badania koncentrują się aktualnie na identyfikacji form larwalnych Strigeidae izolowanych z pijawek jako żywicieli pośrednich, oraz analizie wykorzystania różnych markerów molekularnych do weryfikacji taksonomicznej wybranych taksonów w obrębie tej grupy przywr.

Zamierzam również kontynuować badania nad rolą dziko żyjących ssaków w utrzymywaniu i krążeniu w środowisku patogenów z grupy *vector-borne*. Badania te będą prowadzone w ramach otrzymanego grantu NCN Miniatura 2 oraz współpracy z zespołem prof. Davida Modrego z University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences w Brnie, nawiązanej podczas uczestnictwa w projekcie COST „European Network for Neglected Vectors and Vector-Borne Infections”.

## Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Właściwie od początku podjęcia pracy w Zakładzie Parazytologii Ogólnej Uniwersytetu Wrocławskiego, najpierw jako pracownik techniczny (od 1996 do 2007) a później naukowo-dydaktyczny (od 2007), moje zainteresowania naukowe związane były **helmintami dziko żyjących gryzoni**, który to nurt badawczy został przeze mnie rozpoczęty i jest nadal prowadzony w Zakładzie Parazytologii. Wyniki moich pierwszych badań zostały dotyczyły pasożytów szczurów wędrownych z terenów popowodziowych miasta Wrocławia (Hildebrand i wsp. 1998). Badania faunistyczne i taksonomiczne, obejmujące identyfikację gatunków przywr, tasiemców i nicieni występujących u gryzoni na terenie Dolnego Śląska wraz z analizą ich występowania u różnych gatunków gryzoni prowadziłam najpierw samodzielnie oraz przy współpracy z dr hab. Marcinem Popiołkiem, a od 2004 z dr hab. Grzegorzem Zaleśnym. Na początku **identyfikacja taksonomiczna** helmintów oparta była o cechy morfometryczne, a badania te pozwoliły na wykazanie nowych dla helmintofauny Polski gatunków, m.in. *Brachylecithum glareoli*, *Dentostomella translucida*, *Rodentoxyuris sciuri*, *Syphacia vanderbrueli*, *Trichuris arvicolae* (Hildebrand i wsp. 2004, 2007a, 2017b; Popiołek i wsp. 2009; Zaleśny i wsp. 2006, 2008). Następnie badania faunistyczne i taksonomiczne były sukcesywnie wzbogacane o inne zagadnienia. Jednym z nich były **ekologiczne aspekty kształtowania się helmintofauny gryzoni**, których wyniki stały się podstawą mojej pracy doktorskiej obronionej w 2008 roku, a także publikacji (m.in. Hildebrand i wsp. 2008), w tym dotyczącej przywr digenicznych z uwzględnieniem środowiskowych i żywicielskich uwarunkowań ich występowania (Hildebrand i Zaleśny 2009).

W kolejnym etapie prowadzone badania nad identyfikacją taksonomiczną helmintów zostały przez nas uzupełnione o metody biologii molekularnej, co pozwoliło na weryfikację przynależności taksonomicznej nie tylko dorosłych pasożytów, ale także form larwalnych, jak na przykład tasiemców z rodzaju *Mesocestoides* (Zaleśny i Hildebrand 2012). Zastosowane metody molekularne przyczyniły się także do podjęcia kolejnego nurtu badawczego jakim była **analiza specyficzności żywicielskiej** wybranych gatunków helmintów pasożytujących u gryzoni. Na podstawie uzyskanych danych molekularnych wykazano, że u myszarek (*Apodemus agrarius* i *A. flavicollis*) występuje nicien *Heterakis spumosa*, który był opisywany jako specyficzny pasożyt szczurów *Rattus* ssp. Biorąc pod uwagę historię specjacji rodzaju *Apodemus* i *Rattus* wydaje się, że myszarka polna pozyskała *H. spumosa* już na początku swojej specjacji w Azji (gdzie również znajduje się centrum ewolucji szczura) (Zaleśny i wsp. 2010). Badania nad występowaniem u gryzoni nicieni z rodzaju *Heligmosomoides* pozwoliły stwierdzić, że u *A. agrarius* pasożytuje odrębny gatunek tj. *H. neopolygyrus*, wcześniej znany

jedynie ze wschodniej Azji, a jego obecność w europejskich populacjach myszarki polnej jest przykładem zawleczenia pasożytów (podobnie jak w przypadku *H. spumosa*) podczas zachodniej migracji tego gatunku gryzonia. Znaczenie wyników naszych badań podkreśla fakt, że zweryfikowały one dotychczasowe przekonanie o występowaniu u *A. agrarius* gatunku *H. polygyrus* odrębnego genetycznie od jego form występujących u *A. flavicollis*, co tłumaczono istnieniem północnego refugium w czasie ostatniego zlodowacenia w Europie (Zalesny i wsp. 2014).

Badania nad specyficzną żywicielską przywr stwierdzonych u gryzoni stały się przyczynkiem do podjęcia głębszych analiz taksonomicznych i filogenetycznych w tej grupie helmintów, których to wyniki zostały przedstawione jako osiągnięcie habilitacyjne (publikacje P1-P6).

Za jeden z ciekawszych nurtów badań uważam ten poświęcony **roli gryzoni w rozprzestrzenianiu w środowisku pasożytów o charakterze zoonotycznym**. Wykazaliśmy, po raz pierwszy w Polsce, że gryzonie występujące w obrębie aglomeracji miejskiej biorą udział, jako żywiciele parateniczni, w krążeniu nicieni z rodzaju *Toxocara* (Hildebrand i wsp. 2009). Również po raz pierwszy w środowisku naturalnym stwierdziliśmy występowanie postaci larwalnych nicienia *Aelurostrongylus abstrusus*, pasożyta kotowatych, zarówno u ślimaków nagich *Arion lusitanicus*, które pełnią rolę żywiciela pośredniego, jak i u żywiciela paratenicznego tj. *Apodemus agrarius* (Jeżewski i wsp. 2013). Badania nad rolą ślimaków nagich w krążeniu helmintów w środowisku były prowadzone w ramach współpracy z Instytutem Parazytologii PAN i otrzymanego grantu KBN, w którym byłam głównym wykonawcą. Po wielu latach badań własnych udało się potwierdzić po raz pierwszy w Polsce występowanie *Calodium hepaticum*, nicienia o potencjale zoonotycznym, którego typowym żywicielem są szczury, głównie *Rattus norvegicus* (Buńkowska-Gawlik i wsp. 2017). Z powyższymi nurtem związane były badania dotyczące parazytologicznego monitoringu środowiska (Perec-Matysiak i wsp. 2008) i obejmujące detekcję jaj geohelmintów w próbkach gleby z terenu Wrocławia.

Jestem również współwykonawcą badań i współautorką prac dotyczących helmintofauny przedstawicieli innych grup kręgowców jak płazy, gady czy ptaki lub identyfikacji taksonomicznej poszczególnych gatunków pasożytów występujących u tych żywicieli (Okulewicz i wsp. 2007, 2014, 2015).

W ostatnich latach w kręgu moich zainteresowań naukowych znalazły się również mikropasożyty. Pierwsza grupa, nad którą prowadzone są badania w Zakładzie Parazytologii UW, w których uczestniczę, to **mikropasożyty jelitowe**, w tym mikrosporydia, wykazujące pokrewieństwo z grzybami oraz pierwotniaki z rodzaju *Cryptosporidium* należące do



Apicomplexa. Prowadzone analizy dotyczą roli dziko żyjących zwierząt z różnych grup systematycznych jako środowiskowych rezerwuarów tych mikropasożytów o charakterze zoonotycznym. Wykazano, że gryzonie z rodzajów *Apodemus* i *Myodes* mogą przyczyniać się do rozprzestrzeniania spor *Enterocytozoon bieneusi* i *Encephalitozoon cuniculi* w środowisku, co przypadku *E. bieneusi* było pierwszym doniesieniem z terenu Europy (Perec-Matysiak i wsp. 2015, 2019). Stwierdzono, że gryzonie te stanowią także rezerwuar dla *Cryptosporidium parvum* (Perec-Matysiak i wsp. 2015). Przeprowadzono również identyfikację zróżnicowania genotypów mikrosporidiów i *Cryptosporidium* występujących u gryzoni jak również u introdukowanego w Europie szopa pracza (Lesniańska i wsp. 2016). W przypadku europejskiej populacji szopa są to pierwsze doniesienia dotyczące tych pasożytów.

Druga grupa mikropasożytów występujących u gryzoni, nad którymi badania rozpoczęłam kilka lat temu to wewnątrzkomórkowe pasożytnicze **pierwotniaki i patogeny z grupy vector-borne**, dla których gryzonie pełnią rolę żywicieli rezerwuarowych. Do detekcji tej grupy pasożytów wykorzystywane są tkanki zwierząt głównie krew i śledziona, ale także wątroba czy fragmenty skóry oraz zróżnicowane markery molekularne. Analiza molekularna wewnątrzerytrocytarnych bakterii z rodzaju *Bartonella* przeprowadzona na fragmentach trzech genów wykazała poza występowaniem w populacjach dolnośląskich gryzoni typowych gatunków takich jak *B. grahamii*, *B. taylori* czy *B. birtlesii*, ale także *B. elizabethae* typowego dla szczurów oraz nowego szczepu *Bartonella* specyficznego dla *Apodemus agrarius* (Hildebrand i wsp. 2013). Następnie badania zostały rozszerzone o patogeny takie jak *Borrelia burgdorferi* s.l. i *Borrelia miyamotoi*, *Rickettsia* sp. oraz przedstawicieli rodziny Anaplasmatacae. Cześć z nich została przeprowadzona przy współpracy z prof. Hein'em Sprong'iem z National Institute for Public Health and Environment (The Netherlands), nawiązanej podczas uczestnictwa w programie COST pt. „European Network for Neglected Vectors and Vector-Borne Infections (EURNEGVEC)”. Powyższe badania pozwoliły na stwierdzenie we krwi dziko żyjących gryzoni DNA *Rickettsia helvetica* oraz *Rickettsia felis*-like (Gajda i wsp. 2017), co wskazuje na potencjalną rolę tych zwierząt w rozprzestrzenianiu się *Rickettsia* spp. w cyklach enzootycznych. Aktualnie w przygotowaniu jest praca dotycząca pozostałych z wymienionych patogenów.

Powyższy nurt badawczy został ostatnio rozszerzony o inną grupę żywicielską, jakim są domowe i dziko żyjące ssaki drapieżne, w tym gatunki inwazyjne jak jenot azjatycki i szop pracz. Badania te pozwoliły na pierwsze molekularne stwierdzenie zoonotycznego ekotypu *Anaplasma phagocytophilum* w populacji szopa z terenu zachodniej Polski oraz zidentyfikowanie, również po raz pierwszy, u jenota bakterii *Candidatus Neoehrlichia* sp. szczep FU98 (Hildebrand i wsp. 2018). Dodatkowo w ramach nawiązanej współpracy z prof.

Davidem Modrym z University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences (Brno) przeprowadzono analizę zróżnicowania molekularnego pierwotniaka *Babesia canis*, czynnika etiologicznego babeszjozy psów, wykorzystując markery jądrowe i mitochondrialne, tj. fragmenty genów 18S rRNA oraz cox1 i cytochrom b. Otrzymane wyniki pozwoliły na wykazanie występowania paralogów w obrębie 18S rDNA, co wskazuje na konieczność zastąpienia do tej pory stosowanych genotypów *B. canis* (Hrazdilová i wsp. 2019).

Szczegółowe informacje dotyczące opublikowanych prac i doniesień konferencyjnych oraz udziału w projektach naukowych, jak i informacje o działalności dydaktycznej i organizacyjnej zamieszczone są w załączniku 3.

### Podsumowanie dorobku naukowego

	Liczba prac	IF*	Punkty MNiSW*
Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego	6	12,725	170
Pozostałe publikacje w czasopismach z bazy JCR	25	43,517	635
Publikacje w czasopismach spoza bazy JCR	16	-	92
<b>Publikacje łącznie</b>	<b>47</b>	<b>56,242</b>	<b>897</b>
w tym po uzyskaniu stopnia doktora (od 2008r.)	32	53,799	750
Ekspertyzy przyrodnicze	13	-	-
Doniesienia konferencyjne krajowe i zagraniczne	63	-	-
Liczba cytowań wg Web of Science [all databases] 185			
Index Hirscha wg Web of Science [all databases] 8			

\* wskaźniki podane zgodnie z rokiem opublikowania

**Literatura**

1. Buńkowska-Gawlik K., Percec-Matysiak A., Burzyńska K., Hildebrand J. 2017. The molecular identification of *Calodium hepaticum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*) in Poland. *Acta Parasitologica*, 62(4): 728–732.
2. Carney P.W. 1970. *Brachylecithum mosquensis*: infections in vertebrate, molluscan and arthropod hosts. *Trans. Amer. Microsc. Soc.* 89: 233-250.
3. Denton J.F. 1945. Studies on the life history of *Brachylecithum americanum* n.sp. , a liver fluke of passerine birds. *The Journal of Parasitology*, 31(2): 131-141.
4. Denton, J.F., Byrd, E.E., 1951. The helminth parasites of birds. III. Dicrocoeliid trematodes from North American bird. *Proceedings of the United States National Museum*. 101, 157–202.
5. Dollfus, R., 1954. *Miscellanea Helminthologica Maroccana*. XIII. Deux Dicrocoeliinae d'Oiseaux passeriformes du Maroc. Discussion de quelques genres de Dicrocoeliinae d'Homeothermes. *Arch. Inst. Pasteur du Maroc*. 4, 583-601.
6. Gajda E., Hildebrand J., Sprong H., Buńkowska-Gawlik K., Percec-Matysiak A., Coipan E.C. 2017. Spotted fever rickettsiae in wild-living rodents from south-western Poland. *Parasites & Vectors*, 10: 413 (6 str.)
7. Hildebrand J., Popiołek M., Okulewicz A., Zaleśny G. 2004. Helminthofauna myszy z rodzaju *Apodemus* z okolic Wrocławia. *Wiadomości Parazytologiczne*, 50(3): 623-628
8. Hildebrand J., Zaleśny G., Okulewicz A. 2007. A new whipworm from arvicolid rodents, *Trichuris arvicolae* Feliu et al. 2000, in the helminth fauna of Poland. *Wiadomości Parazytologiczne*, 53(4): 339-342
9. Hildebrand J., Okulewicz J., Popiołek M. 2007. A new dicrocoeliid from the bank vole *Clethrionomys glareolus* (Rodentia, Microtidae). *Journal of Parasitology* 93 (1), 151-154.
10. Hildebrand J., Okulewicz A., Zaleśny G., Percec-Matysiak A. 2008. Site specific influence on the helminth community of small rodents in the Wrocław area (Poland). *Proceedings of 10th European Multicolloquium of Parasitology "From satellites to microsattelites"*, 24-29 August 2008, Paris, France (ISBN: 978-88-7587-459-9, pp. 281): 233-236.
11. Hildebrand J., Zaleśny G. 2009. Siedliskowa i żywicielska specyficzność występowania przywr w zgrupowaniach gryzoni. *Wiadomości Parazytologiczne* 55(4): 389-393
12. Hildebrand J., Zaleśny G., Okulewicz A., Baszkiewicz K. 2009. Preliminary studies on the zoonotic importance of rodents as a reservoir of toxocarasis from recreation grounds in Wrocław (Poland). *Helminthologia* 46: 80-84.
13. Hildebrand J., Paziewska-Harris A., Zalesny G., Harris P.D. 2013. PCR characterisation suggests an unusual range of *Bartonella* species infect the striped field mouse *Apodemus agrarius* in Central Europe. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(16): 5082-5084.
14. Hildebrand J., Buńkowska-Gawlik K., Adamczyk M., Gajda E., Merta D., Popiołek M., Percec-Matysiak A. 2018. The occurrence of Anaplasmataceae in European populations of invasive carnivores. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 9: 934–937.
15. Hrazdilová K., Myśliwy I., Hildebrand J., Buńkowska-Gawlik K., Janaczyk B., Percec-Matysiak A., Modrý D. 2019. Paralogs vs. genotypes? Variability of *Babesia canis* assessed by 18S rDNA and two mitochondrial markers. *Veterinary Parasitology*, 266: 103-110
16. Jeżewski W., Buńkowska-Gawlik K., Hildebrand J., Percec-Matysiak A., Laskowski Z. 2013. Intermediate and paratenic hosts in the life cycle of *Aelurostrongylus abstrusus* in natural environment. *Veterinary Parasitology*, 198 (3-4): 401-405
17. Kingston N. 1965. On the life cycle of *Brachylecithum orfi* Kingston and Freeman, 1959 (Trematoda: Dicrocoeliidae), from the liver of the ruffed grouse, *Bonasa umbellus* L. infections in the vertebrate and molluscan hosts. *Canadian Journal of Zoology* 43(5), 745-764.
18. Kinsella J.M., Tkach V.V. 2009. Molecular identification of an avian dicrocoeliid, *Brachylecithum mosquensis*, from a vagrant shrew, *Sorex vagrans*, in Montana, U.S.A. *Comparative Parasitology* 76 (2): 287-289.
19. Kostadinova A. 1996. Morphological variability of *Brachylecithum microtesiculatum* (Digenea: Dicrocoeliidae) in the Black Sea region. *Folia Parasitologica*: 47-51.
20. Leśnińska K., Percec-Matysiak A., Hildebrand J., Buńkowska-Gawlik K., Piróg A., Popiołek M. 2016. *Cryptosporidium* spp. and *Enterocytozoon bieneusi* in introduced raccoons (*Procyon lotor*)—first evidence from Poland and Germany. *Parasitology Research*, 115(12): 4535–4541
21. Littlewood, D.T.J., Rohde, K., Clough, K.A., 1997. Parasite speciation within or between host species? Phylogenetic evidence from site-specific polystome monogeneans. *Int J Parasitol.* 27, 1289–1297.

22. Littlewood D.T.J., Olson P.D. 2001. Small subunit rDNA and the phylum Platyhelminthes: signal, noise, conflict and compromise. In *Interrelationships of the Platyhelminthes* (Littlewood D.T.J. and Bray R.A., Eds.), Taylor i Francis, London, pp. 262-278.
23. Macko, K., 1968. Beitrag zur Variabilität der Merkmale der Art *Lyperosomum petiolatum* Railliet, 1900. *Biologia*. 23, 377-388.
24. Macko J.K., Mackova A. 1995. Redescription of paralectotypes of *Lyperosomum longicauda* (Rudolphi, 1809) and other data on microcoeliids from Slovakia. *Helminthologia*, 32: 239-246.
25. Mettrick D.F. 1963. A statistical analysis of the morphological variation observed between populations of *Zonorchis petiolatum* (Railliet, 1900) [Trematoda: Dicrocoeliidae] from different hosts and localities. *The Journal of Parasitology*, 49 (5): 745-751.
26. Odening K. 1964. Dicrocoelioidea und Microphalloidea (Trematoda: Plagiorchiata) aus Vogeln des Berliner Tierparks. *Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum in Berlin*, 40 (2): 147-184.
27. Okulewicz A., Okulewicz J., Hildebrand J., Zalesny G. 2007. New data on straggled eyeworm *Oxyspirura chabaudi* (Barus, 1965) (Nematoda, Thelaziidae) in Europe. *Acta Parasitologica* 52 (3): 292-294
28. Okulewicz A., Hildebrand J., Łysowski R., Buńkowska K., Perec-Matysiak A. 2014. Helminth communities of green and brown frogs from Poland (Lower Silesia region). *Journal of Herpetology*, 48(1): 34-37 [IF 0.832; MNiSW 25]
29. Okulewicz A., Kaźmierczak M., Hildebrand J., Adamczyk M. 2015. Endoparasites of lizards (Lacertilia) from captive breeding and trade. *Helminthologia*, 52(1): 34-40
30. Olson P.D., Cribb T.H., Tkach V.V., Bray R.A., Littlewood D.T. 2003. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). *International Journal for Parasitology* 33(7), 733-755.
31. Panin V.Y. 1984. Dicrocoeliid trematodes of the world fauna. „Nauka” Kazakhskoi SSR, Alma-Ata, 249 pp. [In Russian]
32. Perec-Matysiak A., Hildebrand J., Zalesny G., Okulewicz A., Fatuła A. 2008. Ocena stanu zanieczyszczenia jajami geohelmintów na terenie Wrocławia. *Wiadomości Parazytologiczne*, 54(4): 319-323
33. Perec-Matysiak A., Buńkowska-Gawlik K., Zalesny G., Hildebrand J. 2015. Small rodents as reservoirs of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in the area of south-western Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 22(1): 1-5
34. Perec-Matysiak A., Buńkowska-Gawlik K., Kváč M., Sak B., Hildebrand J., Leśniańska K. 2015. Diversity of *Enterocytozoon bieneusi* genotypes among small rodents in southwestern Poland. *Veterinary Parasitology*, 214(3-4): 242-246
35. Perec-Matysiak A., Kinga Lesniańska A., Buńkowska-Gawlik K., Condlova S., Sak B., Kvac M., Rajskey D., Hildebrand J. 2019. The opportunistic pathogen *Encephalitozoon cuniculi* in wild living Murinae and Arvicolinae in Central Europe. *European Journal of Protistology*, 69: 14-19
36. Pojmańska T. 2008. Family Dicrocoeliidae Looss, 1899. W: Bray R.A., Gibson D.I., Jones A (eds) *Keys to the Trematoda*. Volume 1. CAB International and Natural History Museum, London, UK, pp. 233-260.
37. Popiolek M., Hildebrand J., Zalesny G. 2009. Morphology and taxonomy of *Rodentoxyuris sciuri* Quentin et Tenora, 1974 (Nematoda, Oxyurida, Enterobiinae) with notes on molecular phylogeny. *Annales Zoologici* 59(4): 415-421.
38. Ribas A., Makundi R.H., Goüy de Bellocq J. 2012. *Paraconcinnum leirsi* n. sp. (Trematoda, Dicrocoeliidae) from rodents in Tanzania and its phylogenetic position within the dicrocoelids. *African Zoology*, [S.l.], 47(2): 326-331.
39. Sitko J. 1994. Revision of the genus *Brachydistomum* Travassos, 1944 (Digenea: Dicrocoeliidae). *Helminthologia*, 31: 57-65.
40. Sitko J. 1995. Variability and systematic status of *Zonorchis clathratum* (Trematoda, Dicrocoeliidae), a parasite of swifts and swallows. *Folia Parasitologica*, 42: 193-198.
41. Sitko J., Okulewicz J., Noga L. 2000. variability and systematic status of *Lutztrema attenuatum* (Dujardin, 1845) comb. n. (Trematoda: Dicrocoeliidae) parasitizing passeriform birds. *Helminthologia* 37, 97-111.
42. Sitko J., Okulewicz J. 2002. Redescription and systematic status of *Brachydistomum ventricosum* (Rudolphi, 1809) comb.n. (Trematoda: Dicrocoeliidae) parasiting passeriform birds. *Helminthologia* 39: 103-110.
43. Sitko J., Faltynkova A., Scholz T. 2006. Checklist of the Trematodes (Digenea) of birds of Czech and Slovak Republics. *Academia, Praha*, 111 pp.
44. Shtrom, Z.K., 1940. (Notes on the classification of the Dicrocoeliinae (Trematoda)). *Parazitologicheski Sbornik*. 8, 176-188. (In Russian)

45. Skrjabin, K.I., Evranova, V.G., 1952. (Family Dicrocoeliidae Odhner, 1911). In: Skrjabin, K.I. (Ed.), (Trematodes of Animals and Man.) *Osnovy Trematodologii*. Vol. 7. Izdatel'stvo Akademii Nauk SSSR, Moscow, pp. 604. (In Russian)
46. Timon-David J. 1957. [Experimental development of *Brachylecithum alfortense* (A. Railliet) R. Ph. Dollfus 1954, a dicrocoeliid trematode parasite of the biliary tract of magpie.] *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee* 32(4), 353-368. [in French]
47. Timon-David J. 1960. Recherches experimentales sur le cycle de *Dicrocoelioides petiolatum* (C.A. Railliet, 1900) (Trematoda, Dicrocoeliidae). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee* 35: 251-267.
48. Tkach, V.V., Bray, R.A., 1995. *Prosolecithus danubica* n. sp. (Digenea: Dicrocoeliidae), a new digenean from shrews on islands of the Danube delta. *Parasite*. 2,133-140.
49. Tkach V.V., Pawlowski J., Mariaux J., Swiderski Z., 2001. Molecular phylogeny of the suborder Plagiorchiata and its position in the system of Digenea. In: Littlewood, D.T.J., Bray R.A. (Ed.), *Interrelationships of Platyhelminthes*. Taylor & Francis, London, pp. 186-193.
50. Tkach, V.V., Littlewood, D.T.J., Olson, P.D., Kinsella, J.M., Świderski, Z., 2003. Molecular phylogenetic analysis of the Microphalloidea Ward, 1901. *Syst Parasitol.* 56, 1-15.
51. Travassos, L., 1944. Revisao da familia Dicrocoeliidae Odhner, 1910. *Monografias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, pp. 357 + 124 plates.
52. Yamaguti, S., 1958. *Systema helminthum*. Vol. I. The Digenetic Trematodes of Vertebrates. Interscience Publishers, New York, pp. 1575.
53. Yamaguti, S., 1971. *Synopsis of Digenetic Trematodes of Vertebrates*. Vol. I. Keigaku Publishing, Tokyo, pp. 1074
54. Zaleśny G., Hildebrand J., Perek-Matysiak A., Okulewicz A. 2006. First report of *Syphacia vanderbrueeli* Bernard, 1961 (Oxyuridae) from *Micromys minutus* in Poland. *Helminthologia* 43(4): 237-238
55. Zaleśny G., Hildebrand J., Okulewicz A. 2008. *Dentostomella translucida* Schulz & Krepkorgorskaya, 1932 (Nematoda, Heteroxynematidae), a new species for the European nematofauna. *Acta Parasitologica* 53(2): 219-221
56. Zaleśny G., Hildebrand J., Popiolek M. 2010. Molecular identification of *Heterakis spumosa* Schneider, 1866 (Nematoda: Ascaridida: Heterakidae) with comparative analysis of its occurrence in two mice species. *Annales Zoologici* 60(4): 647-655
57. Zaleśny G., Hildebrand J. 2012. Molecular identification of *Mesocestoides* spp. from intermediate hosts (rodents) in central Europe (Poland). *Parasitology Research*, 110(2): 1055-1061
58. Zaleśny G., Hildebrand J., Paziewska-Harris A., Behnke J.M., Harris P.D. 2014. *Heligmosomoides neopolygyrus* Asakawa & Ohbayashi, 1987, a cryptic Asian nematode infecting the striped field mouse *Apodemus agrarius* in Central Europe. *Parasites & Vectors*, 7: 457 (10 str.)

