

Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-15-0134****Genetická diverzita vybraných medicínsky dôležitých nových a novo sa objavujúcich patogénov so zoonóznym potenciálom.**Zodpovedný riešiteľ **doc. MVDr. Monika Halánová, PhD.**Príjemca **Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach - Lekárska fakulta**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Lekárska fakulta
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach
Parazitologický ústav SAV v Košiciach

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

W. Stefanski Institute of Parasitology of the Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland (prof. G. Karbowiak)
Department of Biology and Parasitology, Medical University of Lublin, Lublin, Poland (prof. A. Buczek)
Vytautas Magnus University, Vileikos 8, Kaunas, Lithuania (prof. A. Paulauskas, Doc. J. Radzijeuskaja)
Jacob Blaustein Institutes for Desert Research, Ben Gurion University of the Negev, Midreshet, Ben - Gurion, Israel (prof. B. Krasnov)

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

x

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

Hatalová E., Valenčáková A., Luptáková L., Špalková M., Kalinová J., Halánová M., Bednárová V., Gabzdilová J., Dedinská K., Ondriska F., Boldiš V.: The first report of animal genotypes of *Cryptosporidium parvum* in immunosuppressed and immunocompetent humans in Slovakia. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2019, vol. 66, no. 1, ISSN 1865-1674, 243-249.Halánová M., Petrová L., Halán M., Trbolová A., Babinská I., Weissová T.: Impact of way of life and environment on the prevalence of *Chlamydia felis* in cats as potential sources of infection for humans. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2019, vol 26, no. 2, ISSN 1232-1966, 222-226.Valenčáková A., Danišová O.: Molecular characterization of new genotypes *Enterocytozoon bieneusi* in Slovakia. *Acta Tropica*, 2019, vol. 191, ISSN 0001-706X, 217-220.Csanady A., Stanko M., Mošanský L.: Are differences in variation and allometry in testicular size of two sibling species of the genus *Mus* (Mammalia, Rodentia) caused by female promiscuity? *Mammal Research*, 2019, vol. 64, no. 1, 31-38.

Csanady A., Stanko M., Mošanský L.: Are there differences in the morphology of communal mounds of overwintering mound-building mice (*Mus spicilegus* Petenyi, 1882) in Slovakia? *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 2019, vol. 65, no. 2, 167-180.

Čechová L., Halánová M., Babinská I., Danišová O., Bartkovský M., Marcinčák S., Marcinčáková D., Valenčáková A., Čisláková L.: Chlamydiosis in farmed chickens in Slovakia and zoonotic risk for humans. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2018, vol. 25, no. 2, ISSN 1232-1966, 320-325.

Danišová O., Halánová M., Valenčáková A., Luptáková L.: Sensitivity, specificity and comparison of three commercially available immunological tests in the diagnosis of *Cryptosporidium* species in animals. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2018, vol. 49, no. 1, ISSN 1517-8382, 177-183.

Heglasová I., Víchová B., Kraljik J., Mošanský L., Miklisová D., Stanko M.: Molecular evidence and diversity of the spotted-fever group *Rickettsia* spp. in small mammals from natural, suburban and urban areas of Eastern Slovakia. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 2018, vol. 9, iss. 6, ISSN 1877-959X, 1400-1406.

Kalinová J., Valenčáková A., Hatalová E., Danišová O., Trungelová M., Hromada R.: Occurrence of *Cryptosporidium* in the water basins of Nitra region, Slovakia. *Acta Tropica*, 2018, 179:36-38.

Hatalová E., Valenčáková A.: Combined nested PCR and High Resolution Melting for screening of *Cryptosporidium parvum*. *International Journal of Biology and Biomedical Engineering*, 2018, vol. 12, p. 137-142, ISSN 1998-4510

Babinská I., Halánová M., Kalinová Z., Čechová I., Čisláková L., Madarasová Gecková A.: Prevalence of *Chlamydia trachomatis* Infection and Its Association with Sexual Behaviour and Alcohol Use in the Population Living in Separated and Segregated Roma Settlements in Eastern Slovakia. *Int J Environ Res Public Health*. 2017 Dec 14;14(12). pii: E1579. doi: 10.3390/ijerph14121579.

Danišová O., Valenčáková A., Stanko M., Luptáková L., Hatalová E., Čánády A.: Rodents as a reservoir of infection caused by multiple zoonotic species/genotypes of *C. parvum*, *C. hominis*, *C. suis*, *C. scrofarum*, and the first evidence of *C. muskrat* genotypes I and II of rodents in Europe. *Acta Tropica*, 2017, 172, 29-35.

Hatalová, E., Valenčáková, A., Kalinová, J., Luptáková, Danišová, O., Húska, M.: Comparison of PCR primers for the identification of *Cryptosporidium* spp. and genotypes in calves. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 2017, 20, Suppl. 1, 154-157.

Kalinová, J., Valenčáková, A., Hatalová, E., Danišová, O., Luptáková, L., Šalková, M.: Use of *Artemia franciscana* as a biofilter for catching *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 2017, 20, Suppl. 1, 158-161.

Danišová, O., Halánová, M., Valenčáková, A., Kalinová, J., Hatalová E., Čechová, L.: Identification of *Chlamydia* spp. in small ruminants with ocular infections. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 2017, 20, Suppl. 1, 370-373.

Hatalová E., Valenčáková A., Špalková M. The possible use of brine shrimp *Artemia franciscana* in processing water samples for the diagnosis of *Cryptosporidium* spp. XX. konference mladých vědeckých pracovníků s mezinárodní účastí – Sborník příspěvků, VFU Brno, 30.5.2018.

Čisláková L., Kováčová D.: Monitoring cicavčích chlamydióz na Slovensku za rok 2017. In: *Slovenský veterinársky časopis*, roč. 43, č. 1, 2018, ISSN 1335-0099, s. 66 - 67.

Petríková K., Halánová M., Čisláková L., Logoida M., Kalinová Z., Babinská I., Bednárová V.: Bartonelóza – novo sa objavujúce ochorenie. In: *Slovenský veterinársky časopis*, roč. 43, č. 2, 2018, ISSN 1335-0099, s. 143 -147

Halánová M.: Aktuálna epidemiologická situácia povinne hlásených zoonóz v SR. Problémy súvisiace s chovom zvierat vo svetle všeobecne záväzných právnych predpisov, Košice: ELSEWA, 2018, ISBN 9788089385447, 27-31.

Petrová L., Halánová M., Halán M., Trbolová A., Weissová T.: Chlamydióza u mačiek na východnom Slovensku. *Infekčné a parazitárne choroby zvierat: Zborník príspevkov a abstraktov*, Košice: Univerzita Veterinárneho lekárstva a farmácie v Košiciach, 2018, ISBN 9788080775834, 147-149.

Luptáková, L., Petrovová, E., Valenčáková, A., Hatalová, E., Špalková, M.: Detekcia vývinových štádií vybraných patogénov vo vzorkách pôdy. *Zborník príspevkov a abstraktov*, Košice: Univerzita Veterinárneho lekárstva a farmácie v Košiciach, 2018, ISBN 9788080775834, 158-160.

Danišová O., Valenčáková A., Bartkovský M., Marcinčák S.: Identifikácia *Encephalitozoon cuniculi* u slielok chovaných na konzum. Zborník príspevkov a abstraktov, Košice: Univerzita Veterinárneho lekárstva a farmácie v Košiciach, 2018, ISBN 9788080775834, 155-157.

Luptáková, L., Špalková, M., Valenčáková, A., Hatalová, E.: Morfológia *C. elegans* a jeho úloha v transporte patogénov. Zborník vedeckých prác z konferencie 21. Košický morfológický deň. 30. Máj 2018, 74-77.

Valenčáková, A., Danišová, O., Kandračová, P.: Nové zoonotické genotypy *Enterocytozoon bieneusi* u prasidiat. Zborník príspevkov z VI. ročníka vedeckého kongresu "Zoonózy, alimentárne nákazy a nákazy z vody – spoločná ochrana zdravia ľudí a zvierat", Banská Bystrica, 15.-17. októbra 2018.

Kandračová, P., Danišová O., Tomko, M., Valenčáková, A., Hatalová E.: Výskyt *Blastocystis* spp. a *Cryptosporidium* spp. u voľne žijúcej zveri. Zborník príspevkov z VI. Ročníka vedeckého kongresu "Zoonózy, alimentárne nákazy a nákazy z vody – spoločná ochrana zdravia ľudí a zvierat", Banská Bystrica, 15.-17. októbra 2018.

Halánová M., Logoida M., Petříková K.: Sú novo sa objavujúce zoonózy skutočnou hrozbou pre Slovensko? In: Problémy súvisiace s chovom zvierat vo svetle všeobecne záväzných právnych predpisov: Zborník publikácií z XIX. ročníka vedecko-odbornej konferencie s medzinárodnou účasťou. Košice: Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, 2019, 104-106.

Petříková, K., Logoida, M., Halánová, M.: Bartonelóza novo sa vyskytujúce ochorenie na Slovensku - epidemiologická charakteristika a výskyt. In Problémy súvisiace s chovom zvierat vo svetle všeobecne záväzných právnych predpisov: Zborník publikácií z XIX. ročníka vedecko-odbornej konferencie s medzinárodnou účasťou. 2019. Košice : Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, 2019, 107-112.

Petříková, K., Babinská, I., Halánová, M.: Výskyt bartonelových protilátok u ľudí na východnom Slovensku. In Jarná internacionalizovaná škola doktorandov 2019 : Zborník príspevkov z 6. ročníka Jarnej internacionalizovanej školy doktorandov. 2019. Košice : Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, 2019, 63-66.

Bednárová, V., Juriš, P.: Aktuálna epidemiologická situácia vo výskyte parazitárnych infekcií na Slovensku. In Problémy súvisiace s chovom zvierat vo svetle všeobecne záväzných právnych predpisov: Zborník publikácií z XIX. ročníka vedecko-odbornej konferencie s medzinárodnou účasťou. Košice: Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach. 2019, 99-103.

Bednárová, V., Halánová, M., Papajová, I., Juriš, P.: Endoparazitárne infekcie u detí. In Jarná internacionalizovaná škola doktorandov 2019: Zborník príspevkov z 6. ročníka Jarnej internacionalizovanej školy doktorandov. Košice: Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach. 2019, 11-14.

Petříková, K., Bednárová, V., Logoida, M., Halánová, M.: Bartonelóza - epidemiológia a možnosti laboratórnej diagnostiky. In Zdravotnícke listy: vedecký recenzovaný časopis. 2019. Roč. 7, č. 1 (2019), S. 24-27.

Halánová M., Kalinová Z., Čechová L., Babinská I., Čisláková L.: Prevalence of *Chlamydia felis* infection across various populations of cats and its impact for public health. In: Congress proceeding from 5th annual scientific congress on Zoonoses, Foodborne and Waterborne Diseases – Protection of Public and Animal Health. - Bratislava: Ministry of Agriculture of SR, 2016. - ISBN 9788089702305. - S. 182-185.

Kalinová Z., Halánová M., Čisláková L., Čechová L., Babinská I.: Seroprevalence of anaplasmosis in humans from Eastern Slovakia. In: Congress proceeding from 5th annual scientific congress on Zoonoses, Foodborne and Waterborne Diseases – Protection of Public and Animal Health. - Bratislava: Ministry of Agriculture of SR, 2016. - ISBN 9788089702305. - S. 204-206.

Čechová L., Halánová M., Halán M., Danišová O., Kalinová Z., Babinská I., Čisláková L.: Detection and of *Chlamydia* spp. in different species of birds from Slovakia. In: Congress proceeding from 5th annual scientific congress on Zoonoses, Foodborne and Waterborne Diseases – Protection of Public and Animal Health. - Bratislava: Ministry of Agriculture of SR, 2016. - ISBN 9788089702305. - S. 150-153.

Danišová O., Valenčáková A., Stanko M.: First evidence zoonotic species of *Cryptosporidium* muskrat genotypes I and II of rodents in Slovakia. In: Congress proceeding from 5th annual scientific congress on Zoonoses, Foodborne and Waterborne Diseases –

Protection of Public and Animal Health. - Bratislava: Ministry of Agriculture of SR, 2016. - ISBN 9788089702305. - S. 158-160.

Danišová O., Valenčáková A., Hatalová E., Stanko M., Luptáková L.: Human genotypes of zoonotic pathogens *Cryptosporidium* spp. identified in rodents in Slovakia. In: Congress proceeding from 5th annual scientific congress on Zoonoses, Foodborne and Waterborne Diseases – Protection of Public and Animal Health. - Bratislava: Ministry of Agriculture of SR, 2016. - ISBN 9788089702305. - S. 161-163.

Hatalová, E., Valenčáková, A., Danišová, O., Kalinová, J., Luptáková, L., Ondriska, F., Boldiš, V: Molecular characteristics of genotypes and subtypes of *Cryptosporidium hominis* in Slovakia. In: Congress proceeding from 5th annual scientific congress on Zoonoses, Foodborne and Waterborne Diseases – Protection of Public and Animal Health. - Bratislava: Ministry of Agriculture of SR, 2016. - ISBN 9788089702305. - S. 186-189.

Valenčáková, A., Danišová, O.: Detection zoonotic species *Enterocytozoon bieneusi* in calves. In: Congress proceeding from 5th annual scientific congress on Zoonoses, Foodborne and Waterborne Diseases – Protection of Public and Animal Health. - Bratislava: Ministry of Agriculture of SR, 2016. - ISBN 9788089702305. - S. 281-284.

Regecová I., Pipová M., Jevinová P., Valenčáková A., Danišová O., Mačanga J.: Detection of GBNE encoding enterotoxins in coagulase-negative *Staphylococci* isolated from foods of animal origin. In: Congress proceeding from 5th annual scientific congress on Zoonoses, Foodborne and Waterborne Diseases – Protection of Public and Animal Health. - Bratislava: Ministry of Agriculture of SR, 2016. - ISBN 9788089702305. - S. 242-245.

Halánová M.: Zoonózne ochorenia psov a mačiek a možnosti ich prenosu na ľudí. In: Zborník publikácií zo XVI. roč. ved.-odbor. konf. Problémy súvisiace s chovom zvierat vo svetle všeobecne záväzných právnych predpisov. - Košice: ELSEWA, 2016. - ISBN 9788089385386. - S. 65-68.

Uplatnenie výsledkov projektu

Výsledky a poznatky získané v tomto projekte môžu byť využité a aplikované:

- V klinickej a laboratórnej diagnostike, ako aj v diferenciálnej diagnostike chorôb inej etiológie, pretože štúdium patogenézy ochorení vyvolaných nami sledovanými patogénmi u zvierat prispieva k objasneniu etiopatogenézy týchto závažných infekcií v humánnej populácii, najmä u jedincov s oslabeným imunitným systémom. Okrem toho v prípade mikrosporidiózy, anaplazmózy a bartonelózy je laická, ale aj odborná verejnosť málo informovaná o existencii týchto nákaz, ich klinických príznakoch a možnostiach diagnostiky a terapie. Laboratórna diagnostika týchto nákaz sa v mikrobiologických laboratóriách v SR nevykonáva, hoci naše výsledky potvrdili ich relatívne vysokú prevalenciu v populácii ľudí i zvierat, ktorá by mala byť dostatočným dôvodom na zavedenie rýchlej a presnej diagnostickej metódy do rutinej praxe.
- Pri skvalitnení systému monitorovania vybraných zoonóz poznáním geografických zón s výskytom infikovaných prameňov nákazy a následnou kontrolou rizikových hostiteľov z pohľadu šírenia vybraných zoonotických ochorení medzi zvieratami a ľuďmi.
- V prevencii a terapii ochorení vyvolaných jednotlivými patogénmi.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Monitoringom výskytu závažných nových a novo sa objavujúcich patogénov so zoonóznym potenciálom (kryptosporidií, mikrosporidií, chlamýdií, bartonel, anaplazmiem) v rizikových skupinách populácie - pacienti po transplantáciách, pacienti s HIV/AIDS, pacienti s ťažkými formami primárnych a sekundárnych imunodeficiencií, pacienti s malnutríciou sme stanovili, resp. aktualizovali aktuálnu epidemiologickú a epizootologickú situáciu v ich výskyte a stanovili kvalitatívnu mieru ohrozenia týchto skupín obyvateľstva analýzou jednotlivých genotypov patogénov a rizikových faktorov podieľajúcich sa na ich vzniku a šírení. Zistili sme, že v prípade všetkých sledovaných infekcií ich počet medziročne stúpa, pričom po stanovení miery rizika sa ako najohrozenejšie skupiny u ľudí javia imunodeficientní pacienti, deti a marginalizované skupiny. Stanovením cirkulujúcich genotypov u chlamýdií a mikrosporidií sme na území SR potvrdili prevažujúce zoonotické genotypy, pri *C. psittaci* poprvýkrát na Slovensku genotypy B, E, pri *E. cuniculi* genotyp I, pri *E. bieneusi* genotyp A a F a pri *E. intestinalis* humánny genotyp u hlodavcov. U ošípaných ako významných

prameňov *E. bieneusi* pre ľudí sme identifikovali nové genotypy *E. bieneusi* (nazvané SVK-S1, SVK-S2 a SVK-S3) patriace do skupiny 1, ktorá bola opísaná ako zoonotická skupina. V prípade kryptosporídií sme v skupine onkologických pacientov so sekundárnou imunodeficienciou potvrdili výskyt rôznych genotypov *C. parvum*, pričom genotyp IlaA21G1R1 bol zaznamenaný nielen na Slovensku, ale tiež v kontinentálnej Európe po prvýkrát. Pri porovnaní senzitivity a špecificity komerčných skriningových testov na dôkaz prítomnosti kryptosporídiovej infekcie sme zistili veľmi rozdielne výsledky, preto spoľahlivosť a reprodukovateľnosť imunologických testov ako jediného diagnostického spôsobu je sporná. Z tohto dôvodu sme sa v rámci zlepšenia diagnostiky zamerali na schopnosť HRM analýzy s kombináciou s klasickou PCR zameranou na GP60 gén odlišiť pozitívne, negatívne, falošne pozitívne a nešpecifické amplifikácie na základe rozdielov v štruktúre kriviek topenia a rozdielov v teplote topenia a začali používať túto metódu na diagnostiku. Zaviedli sme aj metodiku spracovania vody na dôkaz prítomnosti oocýst kryptosporídií a spór mikrosporídií. Naše pilotné výsledky ukazujú, že po optimalizácii postupov pri koncentrácii oocýst a spór, ich purifikácii a detekcii PCR metódami, bude možné využiť modelové organizmy (žiabronôžky *Artemia franciscana*) na dôkaz prítomnosti sledovaných patogénov v environmentálnych vzorkách. Vyšetrením odchytených drobných cicavcov a navlajkovaných kliešťov sme potvrdili pretrvávanie prírodných ohnisk na území východného Slovenska, v ktorých je zaznamenaná relatívne vysoká pozitivita u rezervoárových zvierat zohrávajúcich dôležitú úlohu v šírení a udržiavaní sledovaných infekcií.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

By monitoring the incidence of serious emerging and re-emerging pathogens with zoonotic potential (cryptosporidia, microsporidia, chlamydia, bartonella, anaplasma) in at-risk populations - transplant patients, HIV/AIDS patients, patients with severe forms of primary and secondary immunodeficiency, patients with malnutrition we determined, respectively update the current epidemiological and epizootological situation in their occurrence and by analysing individual pathogen's genotypes and risk factors involved in their emergence and dissemination we established a qualitative risk rate to these population groups. We detected that for all of the infections we monitored, their number increased year on year, while immunodeficiency patients, children and marginalized groups belong to the most vulnerable groups after risk assessment. By determining circulating genotypes in chlamydia and microsporidia, we confirmed prevalent zoonotic genotypes in the Slovak republic, genotypes B, E for *C. psittaci*, genotype I for *E. cuniculi*, genotype A and F for *E. bieneusi* and human genotype for *E. intestinalis* in rodents. We identified new *E. bieneusi* genotypes (named SVK-S1, SVK-S2 and SVK-S3) belonging to group 1, which was described as a zoonotic group, in pigs as significant sources of *E. bieneusi* for humans. In the case of cryptosporidia, the occurrence of various *C. parvum* genotypes was confirmed in the group of cancer patients with secondary immunodeficiency, with the genotype IlaA21G1R1 not only in Slovakia but also in continental Europe for the first time. By comparing of sensitivity and specificity of commercial screening assays to the presence of cryptosporidial infection, we detected very different results, therefore the reliability and reproducibility of immunoassays as the only diagnostic method is questionable. For this reason, as part of the diagnostic improvement, we focused on the ability of HRM analysis combined with classical PCR targeting to the GP60 gene to distinguish positive, negative, false positive and non-specific amplifications based on differences in melting curve structure and differences in melting point and began to use this method for diagnostics. We have also introduced a soil treatment methodology to demonstrating the presence of oocysts of cryptosporidia and spores of microsporidia. Our pilot results show that, following optimization of oocyst and spore concentration procedures, their purification and detection by PCR methods, model organisms (microcrustaceans *Artemia franciscana*) can be used to demonstrate the presence of the monitored pathogens in environmental samples. By examining the trapped small mammals and ticks we confirmed the persistence of natural outbreaks in the territory of Eastern Slovakia, where relatively high positivity is observed in reservoir animals playing an important role in the spread and persistence at monitored infections in a given area.