

dr hab. Mirosław Mariusz Michalski
Katedra Parazytologii i Chorób Inwazyjnych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Dąbrowskiej pt. „Występowanie oraz analiza genetyczna *Tritrichomonas foetus* w populacjach zwierząt wrażliwych” („*Tritrichomonas foetus* in susceptible animals – occurrence and molecular analysis”) wykonanej pod kierunkiem Promotora rozprawy Pana dr hab. Jacka Karamona, prof. instytutu z Zakładu Parazytologii i Chorób Inwazyjnych Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach oraz Promotora pomocniczego w osobie Pana dr. hab. Jacka Sroki, prof. instytutu, z tej samej jednostki badawczej.

Podstawę formalną recenzji stanowi pismo z dnia 23 czerwca 2020 r., (BRN-410/6/20) Pana prof. dr hab. Dariusza Bednarka, Przewodniczącego Komisji Doktorskiej Rady Naukowej PIW-PIB w Puławach, zgodnie z Uchwałą Rady Naukowej PIW-PIB z dnia 28.02.2018 r.

Jednokomórkowy pierwotniak *Tritrichomonas foetus* (rzęsistek bydłęcy) został po raz pierwszy wyizolowany w 1888 roku z pochwy krowy i jelita świni (następnie zdiagnozowano pierwotniaka w obrębie nosowych błon śluzowych u świń), ale dopiero w 1933 roku nadano mu jego aktualną i ostateczną nazwę. Pasożyt występuje powszechnie w Europie, jak również w innych rejonach świata. Pierwsze doniesienia o obecności tego pierwotniaka w kale kotów cierpiących na chroniczne biegunki odnotowano w roku 1996. Rzęsistki są obecnie zaliczane do bardzo dużego i zróżnicowanego typu *Parabasalium*. Takson ten tworzą polifilogenetyczne, prymitywne ewolucyjnie, względnie beztlenowe, pozbawione mitochondriów wiciowce. Klasyfikacja taksonomiczna opisywanych organizmów nie jest jednorodna. Do postępu w badaniach nad tymi pierwotniakami znacznie przyczyniło się zastosowanie hodowli *in vitro* na podłożach płynnych lub dwufazowych, które umożliwiły wprowadzenie nowych technik badawczych. Użycie mikroskopii elektronowej, pozwoliło na lepsze poznanie budowy zewnętrznej oraz wewnętrznej przedstawicieli *Parabasalium*, ale prawdziwy przełom przyszedł wraz z upowszechnieniem badań molekularnych.

Typ *Parabasalia* tradycyjnie dzielił się na dwa rzędy *Trichomonadida* i *Hypermastigida*. Gatunki pasożytnicze klasyfikowano w rzędzie *Trichomonadida*, który na podstawie cech morfologicznych oraz budowy wewnętrznej komórki podzielono na pięć rodzin: *Monocercomonadidae*, *Trichomonadidae*, *Calonymphidae*, *Devascovinidae* i *Cochlosomatidae*. Obecnie według National Center for Biotechnology Information (NCBI) do typu *Parabasalia* zalicza się siedem rzędów: *Cristamonadida*, *Honigbergiellida*, *Hypotrichomonadida*, *Spirotrichonymphida*, *Trichomonadida*, *Trichonymphida*, *Tritrichomonadida*. Najważniejsze znaczenie medyczne i weterynaryjne mają rodziny skupione w dwóch rzędach: *Trichomonadida* (rodzina *Trichomonadidae*) i *Tritrichomonadida* (rodziny *Dientamoebidae*, *Monocercomonadidae*, *Tritrichomonadidae*).

W 2010 roku Cepicka i wsp. zaproponowali nową systematykę. Według tej klasyfikacji typ *Parabasalia* podzielono na sześć klas: *Hypotrichomonadea*, *Trichomonadea*, *Tritrichomonadea*, *Cristamonadea*, *Trichonymphea* i *Spirotrichonymphea*. Każda z nich zawiera po jednym rzędzie, z wyjątkiem klasy *Trichomonadea*, która skupia w sobie dwa rzędy *Trichomonadida* i *Honigbergiellida*.

Zdecydowana większość *Parabasalia* to organizmy endobiotyczne, które najczęściej zasiedlają tylne odcinki przewodu pokarmowego. Ich żywicielami są bezkręgowce oraz kręgowce w tym ssaki i człowiek. Nieliczne wyjątki to organizmy wolno żyjące, z przedstawicielami w rodzajach: *Pseudotrichomonas*, *Honigbergiella*, *Monotrichomonas* i *Ditrichomonas*. Część gatunków to komensale albo symbionty tworzące związek mutualistyczny.

Do typu *Parabasalia*, zalicza się gatunki które prowadzą typowo pasożytniczy tryb życia. Niektóre z nich mają duże znaczenie medyczne (*Trichomonas vaginalis*, *Dientamoeba fragilis*) lub weterynaryjne (*Tritrichomonas foetus*, *Histomonas meleagridis*, *Trichomonas gallinae*). Największą patogenność przypisuje się gatunkom lokalizującym się poza jelitem (*Trichomonas vaginalis*, *Tritrichomonas foetus*, *Histomonas meleagridis*). W jamie ustnej ssaków lokalizuje się kilka gatunków rzęsistków z dwóch rodzajów *Trichomonas* i *Tetratrichomonas*. Po jednym gatunku w jamie gębowej opisano u ptaków (*Trichomonas gallinae*) i gadów (*Hypotrichomonas* sp.).

Najczęściej do zarażenia rzęsistkami dochodzi poprzez kontakt bezpośredni. Według większości prac formą inwazyjną, a zarazem patogenną jest trofozoit. Ostatnie badania nad *T. vaginalis* oraz *T. foetus* świadczą, że postać pseudocysty może również odgrywać znaczącą rolę w inwazjologii rzęsistkowicy. Potwierdzono, że pseudocysty w porównaniu z trofozoitami charakteryzują się większą wytrzymałością na czynniki środowiska zewnętrznego oraz wykazują wyższą zdolność adherencji do komórek gospodarza. Dużą rolę w rozprzestrzenianiu inwazji odgrywają bezobjawowi nosiciele. Przyjmuje się, że niektóre rzęsistki mogą w sprzyjających warunkach przeżyć kilka dni poza organizmem żywiciela. Możliwe jest więc również zarażenie pośrednie poprzez

zanieczyszczoną pierwotniakami wodę i pokarm. Różna jest specyficzność żywicielska oraz narządowa rzęsiśtków. Spotkać można zarówno gatunki stenokseniczne, oligokseniczne jak i polikseniczne.

Chorobotwórczość poszczególnych gatunków rzęsiśtków a nawet ich szczepów jest różna i zależy od wielu czynników. Gatunki których typowym miejscem lokalizacji jest jelito grube w większości wydają się być niepatogenne lub mało patogenne, podczas gdy gatunki występujące pozajelitowo działają chorobotwórczo na organizm żywiciela. W ostatnich dwóch dekadach *T. foetus* został zidentyfikowany jako przyczyna zakażeń jelitowych i biegunek u kotów. Niestety, leczenie tej inwazji u kotów jest problematyczne, głównie ze względu na brak swoistych objawów, trudne ich różnicowanie, współistniejące zakażenia bakteryjne, a także brak terapii celowanej dla kotów. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy *T. foetus* nie stanowi zagrożenia zoonotycznego, należy jednak zachować ostrożność w przypadku osób o obniżonej odporności.

Konwencjonalne metody parazytologiczne wykorzystywane w diagnostyce rzęsiśtków obejmują: badanie mikroskopowe preparatów bezpośrednich z wymazów błon śluzowych, badanie mikroskopowe preparatów utrwalonych i barwionych oraz metody hodowlane. Metody doskonalsze i skuteczniejsze to – badania molekularne i metody immunologiczne.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi zbiór czterech publikacji (jedna praca przeglądowa oraz trzy prace oryginalne) poprzedzona zwięzłym opracowaniem całości przeprowadzonych badań. Opracowanie liczy 39 stron, poprzedzone jest Spisem treści oraz Wykazem publikacji stanowiących rozprawę doktorską i składa się z 6 rozdziałów, takich jak Wstęp (podzielony na podrozdziały od 1.1 do 1.4), Cel i zakres pracy, Omówienie realizacji badań, Wnioski, Streszczenie (Summary) i Piśmiennictwo oraz od strony nr 40 Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej.

Tytuł dysertacji doktorskiej odpowiada w pełni jej merytorycznej treści.

Wstęp do rozprawy doktorskiej oparto na publikacji przeglądowej: Dąbrowska J., Karamon J., Kochanowski M., Cencek T.: „*Tritrichomonas foetus* as a causative agent of tritrichomonosis in different animal hosts”. *Journal of Veterinary Research* 2019, 63, 533-541.

Przedstawione w cytowanej pracy fakty naukowe stały się podstawą podjęcia badań przez Doktorantkę.

W rozdziale Cel i zakres pracy Doktorantka jasno ukazała cel badań, a była nią ocena występowania oraz analiza genetyczna *Tritrichomonas foetus* w populacjach zwierząt wrażliwych w Polsce. Cel pracy Doktorantka postanowiła zrealizować w trzech wytyczonych etapach badawczych, opisanych poniżej. Wymieniona część rozprawy należycie spełnia swoje zadanie.

Tematyka badawcza Nr 1

Opracowanie czulej i specyficzej metody służącej do identyfikacji *T. foetus* u zwierząt wrażliwych oraz analiza porównawcza z innymi istniejącymi już metodami biologii molekularnej.

Dąbrowska J., Karamon J., Kochanowski M., Gottstein B., Cencek T., Frey C.F., Müller N.: Development and comparative evaluation of different LAMP and PCR assays for coprological diagnosis of feline tritrichomonosis. *Veterinary Parasitology* 2019, 273, 17-23.

W cytowanej pracy przedstawiono dwie nowe metody biologii molekularnej tj. real-time PCR (**rt-TF-rDNA-2-PCR**) i LAMP (**TF- β tub-LAMP**) służące do identyfikacji *T. foetus* oraz porównano je z obecnie istniejącymi: c-TF-rDNA-PCR wg Felleisen, rt-TF-rDNA-1-PCR oraz TF-elf1 α 1-LAMP wg Oyhenart. Zestaw czterech specyficznych starterów do testu LAMP (**TF- β tub-LAMP**), zaprojektowano na podstawie po raz pierwszy użytej w diagnostyce rzęsistkowicy sekwencji genu kodującego białko β -tubulinę (nr akcesyjny GenBank: JX399872.1). Test **rt-TF-rDNA-2-PCR** był zmodyfikowaną wersją wcześniej opracowanego testu rt-TF-rDNA-1-PCR wg Frey z zastosowaniem skróconych starterów. Profil reakcji i składniki mieszaniny reakcyjnej pozostały bez zmian i były zgodne z wcześniejszą metodyką. W badaniach wykorzystano hodowle szczepu referencyjnego ATCC 30924 (genotyp bydlęcy) oraz próbki kału od kotów.

W celu określenia specyficzności porównywanych metod biologii molekularnej do diagnostyki rzęsistkowicy dodatkowo wykorzystano genomowe DNA następujących mikroorganizmów: *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas gallinae*, *Trichomonas gallinarum*, *Trichomonas mobilensis*, *Tritrichomonas foetus*/*Trichomonas suis*, *Pentatrichomonas hominis*, *Giardia duodenalis*, *Escherichia coli*, *Simplicimonas* sp. Czulość oraz specyficzność obu testów została porównana z wcześniej opublikowanymi metodami biologii molekularnej tj. c-TF-rDNA-PCR wg Felleisen, rt-TF-rDNA-1-PCR (Frey et al., 2017) oraz TF-elf1 α 1-LAMP wg Oyhenart (Oyhenart i wsp., 2018). Ponadto w celu dokładniejszej oceny skuteczności testów LAMP zastosowano dodatkowo protokół umożliwiający wizualne (kolorometryczne) wykrywanie produktów amplifikacji bez użycia termocyklera.

Spośród 5 ocenianych metod najwyższą czulość ocenioną przy badaniu wzbogaconych próbek wody i kału (rozcieńczenie <1 rzęsistka w próbce) uzyskano w reakcjach amplifikacji w czasie rzeczywistym tj. rt-TF-rDNA-2-PCR oraz rt-TF-rDNA-1-PCR. Granica wykrywalności dla pozostałych testów (TF-elf1 α 1-LAMP, TF- β tub-LAMP i c-TF-rDNA-PCR) była niższa i odpowiadała 1 komórce rzęsistka w badanej próbce. W badaniach nad specyficznością dotyczącą porównywalnych metod uzyskano negatywny wynik dla *T. vaginalis*, *T. gallinae*, *T. gallinarum*, *P. hominis*, *G. duodenalis*, *E. coli*. Jednakże, w przypadku *T. suis* i *T. mobilensis* zgodnie z oczekiwaniami wszystkie testy amplifikowały DNA izolowane z tych mikroorganizmów. Z kolei najwyższą czulość diagnostyczną w

badaniu próbek pochodzących od kotów z podejrzeniem rzęsistkowicy uzyskano z użyciem nowo opracowanych testów TF- β tub-LAMP, rt-TF-rDNA-2-PCR i TF-elf1 α 1-LAMP, za pomocą których stwierdzono 8 wyników dodatnich (spośród 20 badanych). Czulość diagnostyczna obu testów LAMP w oznaczeniu kolorymetrycznym była taka sama. Pozostałe metody wykazywały znacznie niższą skuteczność w wykrywaniu pasożyta.

Wyniki przeprowadzonych przez Doktorantkę badań, zawierają się w opisanym podsumowaniu - opracowane w trakcie realizacji tego zadania metody: real time PCR (rt-TF-rDNA-2-PCR) oraz LAMP (TF- β tub-LAMP), okazały się skuteczne w identyfikacji *T. foetus* i mogą stanowić alternatywę dla obecnie używanych metod w diagnostyce rzęsistkowicy.

Tematyka badawcza Nr 2

Analiza genetyczna szczepów rzęsistka wyizolowanych od bydła, kota i świni.

Dąbrowska J., Keller I., Karamon J., Kochanowski M., Gottstein B., Cencek T., Frey C.F., Müller N.: Whole genome sequencing of feline strain of *Trichostrongylus axei* reveals massive genetic differences to bovine and porcine isolates.

International Journal for Parasitology 2020, 50 (3), 227-233.

W cytowanej pracy doświadczalnej przedstawione zostały wyniki badań nad genomami rzęsistka izolowanego od trzech różnych żywicieli z zastosowaniem technologii głębokiego sekwencjonowania (WGS). **Dodatkowo**, po raz pierwszy na świecie został zsekwencjonowany *T. foetus* od kota i świni. W pracy przedstawiono również 25 nowych markerów molekularnych, dzięki którym możliwe jest wskazanie różnic genetycznych między rzęsistkami od trzech różnych gospodarzy. Do badań użyto następujących szczepów rzęsistków: szczep *T. foetus* od bydła – pochodzący z banku mikroorganizmów referencyjnych i linii komórkowych ATCC, nr referencyjny ATCC 30924, szczep *T. foetus* od kota – pozyskany z Instytutu Parazytologii w Bernie, w Szwajcarii, szczep świński *T. foetus/ T.suis* – pochodzący z banku mikroorganizmów referencyjnych i linii komórkowych ATCC, nr referencyjny ATCC 30167, izolaty DNA: DP-Puławy-16 i DP-Puławy-72 od kotów – pozyskane z Zakładu Parazytologii, Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach. Materiał genetyczny pochodził od zwierząt z klinicznie potwierdzoną rzęsistkowicą. Pierwszym etapem analiz wyników było przygotowanie bibliotek wszystkich 3 genomów rzęsistka, nazwanych odpowiednio: TF1 (genom bydły), TF2 (genom koci) i TF3 (genom świński). Analiza bioinformatyczna danych polegała na wyszukiwaniu w chromosomach TF1, TF2 i TF3 różnic genetycznych (insercji/delecji=InDel i SNP) oraz ich lokalizacji w odniesieniu do genomu referencyjnego *T. foetus* od bydła tj. ASM183968v1, 2017) a także

porównaniu ich między sobą. Etap ten obejmował: mapowanie za pomocą oprogramowania Bowtie2 v. 2.3.4.1, Picard-tools v. 2.2.1, samtools flagstat v. 1.4 oraz Genome Analysis Toolkit (GATK) v. 3.7. W oparciu o uzyskane dane wyselekcjonowano 25 nowych markerów molekularnych pozwalających na wskazanie różnic między szczepami *T. foetus* od bydła i kota. Następnie opracowano 25 reakcji PCR (20 w oparciu o Indel i 5 w oparciu o SNP) występującymi w genomie *T. foetus* od kota. Przy zastosowaniu technologii WGS wygenerowano 131M (bydlęcy TF1), 162M (koci TF2) oraz 484M (świński TF3) sparowanych odczytów sekwencji. Całkowite wskaźniki dopasowania (alignment) w stosunku do genomu referencyjnego *T. foetus* wyniosły odpowiednio: 59,3% (TF1), 81,5% (koci TF2) i 62,8% (świński TF3). Liczbę pojedynczych nukleotydowych polimorfizmów tj. SNP oraz insercji i delecji (InDels) we wszystkich 3 genomach porównano z referencyjnym szczepem rzesistka bydlęcego. Najwięcej wyraźnych różnic zidentyfikowano w TF2 (338 632) w stosunku do TF1 (39 784) i TF3 (38 916) co wskazuje jednoznacznie na bliskie pokrewieństwo genetyczne szczepów *T. foetus* od bydła i świni ze szczepem referencyjnym, podczas gdy rzesistek izolowany od kota wydaje się mieć odrębne pochodzenie filogenetyczne. Przeprowadzone analizy wykazały bardzo duże różnice genetyczne między izolatami *T. foetus* pochodzącymi od kotów a izolatami pochodzącymi od bydła i świń. Jednocześnie wykazano duże podobieństwo genetyczne pomiędzy izolatami bydlęcymi i świńskimi. **Jak zaznaczyła w swojej pracy Doktorantka**, otrzymane wyniki mogą być podstawą do dalszych badań nad możliwością transmisji rzesistka pomiędzy różnymi gatunkami zwierząt.

Tematyka badawcza Nr 3

Ocena występowania *T. foetus* w populacjach bydła, kotów i świń w Polsce.

Dąbrowska J., Karamon J., Kochanowski M., Sroka J., Skrzypek K., Jabłoński A., Cencek T: *Tritrichomonas foetus*: a study of prevalence in animal hosts in Poland. *MDPI Pathogens*, 2020, 9(3), 203.

Cytowana praca doświadczalna przedstawia badania nad występowaniem *T. foetus* u zwierząt uznawanych jako wrażliwe na zarażenie tym pierwotniakiem tj. bydła, kotów, świń oraz dzików. Doktorantka zgromadziła 117 próbek kału kotów z 9 województw: dolnośląskiego, kujawsko-pomorskiego, lubelskiego, małopolskiego, mazowieckiego, pomorskiego, świętokrzyskiego, warmińsko-mazurskiego i wielkopolskiego. Badanie obejmowało 172 wymazy z jam nosowych świń, które zostały pobrane w latach 2015–2017. Próbkę pochodziły z rzeźni i klinik weterynaryjnych z województw: kujawsko-pomorskiego, pomorskiego i zachodniopomorskiego. Ponadto do badań pozyskano 236 próbek od dzików. Wymazy z jam nosowych pobierano od zwierząt upolowanych w 11

województwach (dolnośląskie, kujawsko-pomorskie, lubelskie, łódzkie, mazowieckie, opolskie, podkarpackie, pomorskie, śląskie, warmińsko-mazurskie i zachodniopomorskie). Wymazy i popłuczyny od bydła pozyskano od zwierząt w ramach rutynowych badań prowadzonych w Zakładzie Parazytologii w latach 2015-2017. Próbki pochodziły z 7 województw: lubelskiego, lubuskiego, łódzkiego, mazowieckiego, podlaskiego, pomorskiego, świętokrzyskiego. Materiał genetyczny stanowiący izolaty DNA od bydła, kotów i świń przebadano na obecność *T. foetus* za pomocą PCR wg Felleisen oraz nowo opracowanej metody LAMP (Dąbrowska i wsp., 2019). Uzyskane wyniki analizowano przy użyciu programu Statistica v10 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) określając odsetek zwierząt (kotów i świń), u których zidentyfikowano *T. foetus*. Ponadto oszacowano czynniki ryzyka wpływające na rzęsistkowicę u kotów i świń. Spośród 117 próbek kału kotów 24 z nich było dodatnich w teście LAMP i 21 w badaniu za pomocą metody PCR. Całkowita częstość występowania, opisana jako łączne wyniki uzyskane za pomocą LAMP i PCR wyniosła 20,51%. Analizy zgromadzonych danych wykazały, że statystycznie istotne różnice uzyskano między grupami zwierząt pod względem wieku, rasy, liczby kotów w hodowli, występowania biegunki i miejsca zamieszkania. **Doktorantka wykazała**, że czynniki predysponujące do wystąpienia rzęsistkowicy to: wiek poniżej 1 roku, występowanie biegunki, utrzymywanie w hodowli liczącej więcej niż 4 koty oraz rasa (koty rasowe były zarażone istotnie częściej). W badaniach materiału biologicznego od świń, odsetek dodatnich wyników wyniósł 16,28%, a uzyskane dane wykazały istotnie częstsze występowanie rzęsistków u świń młodszych. Wszystkie przebadane próbki od dzików były ujemne w obu testach w kierunku *T. foetus*. Ponadto nie stwierdzono występowania rzęsistkowicy w próbkach od bydła z Polski, co jest zgodne z danymi z innych krajów Unii Europejskiej. **Doktorantka trafnie zauważyła**, że biorąc pod uwagę duże podobieństwo genetyczne *T. foetus* występującego u świń, można przypuszczać, że istnieje ryzyko ponownego wprowadzenia tego pasożyta do populacji bydła w Polsce.

Rozdział zatytułowany „Omówienie realizacji badań” obejmuje trzy omówione wyżej zadania badawcze. Tematycznie stanowi zwartą całość, jest wyczerpujący i ciekawy. **Świadczy** o właściwym przygotowaniu teoretycznym i umiejętnościach analitycznych Autorki pracy. **Potwierdza też** bardzo dobrą znajomość tematu przez Doktorantkę.

Z przyjemnością podkreślam, że Doktorantka pokonała znane wszystkim autorom takich ocen trudności interpretacyjne i z precyzją godną badacza sformułowała w rozdziale „Wnioski” cztery prawidłowe i ważne wnioski obejmujące całokształt opisywanych badań.

Wymienione wnioski **dowodzą** osiągnięcia założonych celów. **Udowadniają one** celowość podjętych badań i stanowią ważne wytyczne dla dalszych badań naukowych oraz z pewnością dla wielu lekarzy weterynarii.

Zdaniem Recenzenta najważniejszy jest wniosek pierwszy, drugi i czwarty. Wniosek trzeci oddala w zapomnienie badania innych polskich autorów i sugestia jego przeredagowania została zamieszczona w dalszej części recenzji.

Rozdział „Streszczenie” wprowadza czytającego w pełny zakres przeprowadzonych badań oraz ich wyników. Opisy bardzo specjalistycznych badań molekularnych są czytelne nawet dla osób nie zajmujących się bliżej tego typu tematyką. Czytając ten fragment rozprawy doktorskiej mamy szybką możliwość oceny doboru tematu badań oraz ich wyników końcowych w kontekście zastosowanych metod diagnostycznych i ich przydatności praktycznej.

Prezentowana bibliografia jest wystarczająco obszerna, obejmuje 87 pozycji piśmiennictwa (głównie angielskojęzycznego), jest dobrze dobrana i właściwie ilustruje badaną tematykę. Ponadto wzbogaca zawarty w rozprawie zasób wiedzy na temat omawianych zagadnień.

Na końcu rozprawy umieszczono kopie czterech prac – jednej przeglądowej i trzech oryginalnych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, opublikowanych w czasopismach znajdujących się na liście czasopism punktowanych przez MNiSW, takich jak: „Journal of Veterinary Research”, „Veterinary Parasitology”, „International Journal for Parasitology”, i „MDPI Pathogens”, których Impact Factor mieści się między 0,829 a 3,478. Uzyskany sumaryczny IF wynosi 9,721, a liczba punktów wg MNiSW – 380. Prace zostały opublikowane w latach 2019-2020.

Wykaz prac stanowiących rozprawę doktorską:

I. Praca przeglądowa

1. Dąbrowska J., Karamon J., Kochanowski M., Cencek T.:

Tritrichomonas foetus as a causative agent of tritrichomonosis in different animal hosts.

Journal of Veterinary Research 2019, 63, 533-541

Punkty MNiSW= 40; IF₂₀= 0,829

II. Prace oryginalne

1. Dąbrowska J., Karamon J., Kochanowski M., Gottstein B., Cencek T., Frey C.F., Müller N.:

Development and comparative evaluation of different LAMP and PCR assays for coprological diagnosis of feline tritrichomonosis.

Veterinary Parasitology 2019, 273, 17-23

Punkty MNiSW= 140; IF₂₀= 2,009

2. Dąbrowska J., Keller I., Karamon J., Kochanowski M., Gottstein B., Cencek T., Frey C.F., Müller N.:
Whole genome sequencing of feline strain of *Tritrichomonas foetus* reveals massive genetic differences to bovine and porcine isolates.
International Journal for Parasitology 2020, 50 (3), 227-233
Punkty MNiSW= 100; IF₂₀= 3,478
3. Dąbrowska J., Karamon J., Kochanowski M., Sroka J., Skrzypek K., Jabłoński A., Cencek T:
Tritrichomonas foetus: a study of prevalence in animal hosts in Poland.
MDPI Pathogens 2020, 9(3), 203
Punkty MNiSW= 100; IF₂₀=3,405

W pracach oryginalnych zostały zawarte szczegółowe opisy doświadczeń wraz z wynikami i dyskusją. **Należy w tym miejscu podkreślić bardzo dobry dorobek punktowy** uzyskany dzięki wymienionym wyżej publikacjom – 380 punktów według wykazu MNiSW i IF=9,721.

We wszystkich wymienionych publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, co zasługuje na uznanie i nie pozostawia wątpliwości o jego głównym wkładzie w powstawaniu wymienionych prac, o czym dodatkowo świadczą załączone oświadczenia współautorów. Wiemy, że wymienione czasopisma uważnie wybierają do druku nadsyłane manuskrypty, stąd, ich ukazanie się drukiem świadczy o odpowiednio wysokim warsztacie badawczym Autorki i Współautorów oraz ciekawie dobranej tematyki badawczej.

Reasumując, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi wartościowy materiał będący bardzo cennym uzupełnieniem naszej dotychczasowej wiedzy z zakresu występowania i diagnostyki *Tritrichomonas foetus* opartej na najnowszych zdobyczach techniki molekularnej, w skali krajowej oraz międzynarodowej. Nasilające się na terenie kraju przypadki inwazji *T. foetus* u kotów wymagają pojawienia się na rynku weterynaryjnym czułych testów diagnostycznych. Doktorantka doskonale „odpowiedziała” na tego typu wyzwanie i opracowała czułe, skuteczne i szybkie testy służące do identyfikacji materiału genetycznego *T. foetus* z kału kotów, tj. TF- β tub-LAMP oraz rt-TF-rDNA-2-PCR. Przy projektowaniu starterów do metody TF- β tub-LAMP **po raz pierwszy na świecie** użyła do tego celu nowego markera genetycznego tj. genu kodującego białko β -tubulinę. Doktorantka **dostrzegła również problem** występowania fałszywie dodatnich wyników w reakcji z DNA *Simplicimonas* sp. we wcześniej opracowanym rt-TF-rDNA-1-PCR wg Frey (Frey i wsp., 2017) i w związku z tym stworzyła jego nową wersję nazwaną rt-TF-rDNA-2-PCR.

Ważnym wnioskiem jest wykazanie dużych różnic genetycznych między izolatami *T. foetus* pochodzącymi od kotów, a izolatami pochodzącymi od bydła i świń. Jak podsumowuje to Doktorantka - przeprowadzone analizy dostarczyły nowej wiedzy na temat genetycznej struktury genomów *T. foetus* od bydła, kota i świni, które mogą być przydatne w przyszłych badaniach nad transmisją rzęsistka w obrębie różnych gospodarzy. Przeprowadzone badania obejmowały także ocenę występowania rzęsistka u zwierząt wrażliwych (bydła, kotów, świń oraz dzików) z terenu Polski (analizy nad występowaniem *T. foetus* w próbkach od kotów i świń nie były jak dotąd udokumentowane w Polsce). Do badań włączono także próbki od dzików i prawdopodobnie jest to pierwsza próba identyfikacji *T. foetus* u tych zwierząt. Przedstawione dane są bardzo cenne dla polskich parazytologów oraz dla lekarzy weterynarii zajmującymi się leczeniem i profilaktyką w stadach bydła i trzody chlewnej, jak również dla lekarzy z państwowych służb weterynaryjnych.

Na szczególną uwagę zasługuje opracowanie własnej procedury real-time PCR (**rt-TF-rDNA-2-PCR**) i LAMP (**TF- β tub-LAMP**) do skutecznej i czułej diagnostyki *Tritrichomonas foetus*.

Przedstawione w rozprawie doktorskiej badania własne dostarczyły interesujących i wartościowych **wyników poznawczych i aplikacyjnych**, tym samym stanowią szczególny wkład Pani mgr inż. Joanny Dąbrowskiej w rozwój nauk weterynaryjnych **i zasługują na wysoką ocenę**.

Jest rzeczą niezmiernie cenną, że Doktorantka podjęła się badań z opisanego wyżej zakresu. Niektóre spostrzeżenia Autorki jak i opracowane procedury diagnostyczne będą z pewnością służyły przez długie lata krajowym ośrodkom badawczym i będą mogły być podstawą analizy sytuacji epidemiologicznej oraz epizootycznej w zakresie występowania i rozprzestrzenienia *Tritrichomonas foetus* wśród populacji kotów, bydła oraz świń.

Godnym uwagi jest podkreślenie fachowego poruszania się Doktorantki w tej bardzo wymagającej tematyce badań. Należy także nadmienić, że badania zostały przeprowadzone dzięki wsparciu finansowemu pochodzącemu z dwóch tematów statutowych PIW-PIB w Puławach oraz projektowi badawczemu Instytutu Parazytologii, Uniwersytetu w Bernie (Szwajcaria).

Szczegółowa analiza rozprawy ujawniła jednak, że autorka **nie ustrzegła się kilku nieścisłości**, które z obowiązku recenzenta zmuszony jestem przedstawić w formie uwag krytycznych.

Uwagi ogólne:

Wniosek trzeci należy nieznacznie przeredagować. Pierwsze szeroko rozpowszechniane doniesienia dotyczące inwazji *T. foetus* u kotów w Polsce pochodziły z ośrodka wrocławskiego (dr Andrzej Połozowski i dr Jarosław Pacoń). Należy także wskazać na bardzo ciekawe badania przeprowadzone przez

dr Klaudiusza O. Szczepaniaka z ośrodka lubelskiego (zakończony w 2013 r. rozprawą doktorską pt. „Morfometryczna, biochemiczna i molekularna charakterystyka rzęsistków izolowanych od psów i kotów z zapaleniem jamy ustnej”). Badania nad inwazją *T. foetus* u kotów prowadził także dr Wojciech Zygmunt w ośrodku warszawskim. Wynika z tego, że we wniosku wskazana jest wzmianka o potwierdzeniu obserwacji innych autorów (lub o innych wnioskach w stosunku do badań wymienionych autorów).

Uwagi dotyczące drobnych błędów w tekście:

Strona 1, trzeci akapit – „rzęsistek bydlęcy ma kształt gruszki”. Powinno się używać określenia „kształtu gruszkowatego”. W publikacji w „Życiu Weterynaryjnym” z 2014 roku, Doktorantka użyła prawidłowego nazewnictwa – „kształtu wrzecionowatego lub gruszkowatego”.

Strona 18, drugi akapit – „zaprojektowano na postawie”. Powinno być – „na podstawie”.

Przedstawione uwagi, nie umniejszają wartości recenzowanej rozprawy doktorskiej i nie mają wpływu na jej pozytywną i wysoką ocenę.

Podsumowując całościowo ocenianą rozprawę doktorską, stwierdzam, że należy do wyróżniających się, a zwłaszcza pod względem aktualności tematu. Podjęte badania poza znaczeniem czysto naukowym, mają dodatkowo ważny aspekt praktyczny.

Recenzowana dysertacja stanowi **oryginalne rozwiązanie zagadnienia naukowego** i świadczy o dojrzałości naukowej jego Autorki do samodzielnego prowadzenia pracy badawczej. Zwraca również uwagę, bardzo ciekawe odnośnie się w różnych fragmentach pracy do porównywalnych badań światowych.

Badania przeprowadzone przez Panią mgr inż. Joannę Dąbrowską stanowią nowy, oryginalny wkład do światowych oraz krajowych badań w opisywanej tematyce badawczej. Należy także dodać, że recenzowana rozprawa doktorska powstawała pod kierunkiem dwóch bardzo dobrych i rzetelnych naukowców, mianowicie, Pana dr hab. Jacka Karamona, prof. instytutu, pełniącego funkcję Promotora rozprawy oraz Pana dr hab. Jacka Sroki, prof. instytutu, pełniącego funkcję Promotora pomocniczego.

Reasumując przedstawioną ocenę, uważam, że recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr inż. Joanny Dąbrowskiej pt. „Występowanie oraz analiza genetyczna *Tritrichomonas foetus* w populacjach zwierząt wrażliwych” **odpowiada w pełni** warunkom określonym w Art. 12.1 i 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65 z 2003 r., poz. 595, Dz. U. z 2014 r. ze

zmianami Dz. U. z 2015 r.) oraz warunkom określonym w § 6 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22 września 2011 roku w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora. Wobec wymienionego faktu, przedkładam Komisji Doktorskiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach (zgodnie z Uchwałą Rady Naukowej PIW-PIB w Puławach podjętej w dniu 28.02.2018 r.) **wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Joanny Dąbrowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i nadania w/w stopnia doktora nauk weterynaryjnych.**

Jednocześnie chciałbym złożyć wniosek o wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej przez Dyrektora PIW-PIB w Puławach stosownie do zapisów w Regulaminie. Uzasadnienie mojego wniosku zostało już sformułowane w poszczególnych punktach niniejszej recenzji – dobrze i nowatorsko dobrana tematyka badań, rodzaj i zakres badań pionierski w skali kraju, opracowanie własnej procedury diagnostycznej, przy projektowaniu starterów użycie po raz pierwszy na świecie nowego markera genetycznego, opublikowanie wyników badań naukowych w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym i wysokim wskaźniku cytowań (IF), duża wiedza merytoryczna i doskonałe opanowanie warsztatu badawczego.

dr hab. Mirosław Mariusz Michalski



Olsztyn, dnia 21.07.2020 r.