

Warszawa, 14 sierpnia 2020 r.

Dr hab. Elżbieta Gołąb prof. NIZP-PZH
Zakład Parazytologii i Chorób Przenoszonych przez Wektory
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – PZH
ul. Chocimska 24
00-791 Warszawa

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Dąbrowskiej
pt. „Występowanie oraz analiza genetyczna *Tritrichomonas foetus*
w populacjach zwierząt wrażliwych”

Promotor: dr hab. Jacek Karamon, prof. instytutu
Promotor pomocniczy: Jacek Sroka, prof. instytutu

Obiektem badań Pani mgr Joanny Dąbrowskiej jest kosmopolityczny pierwotniak *Tritrichomonas foetus*. Ten opisany po raz pierwszy ponad 120 lat temu organizm nadal intryguje badaczy i jednocześnie stanowi poważne zagrożenie epidemiologiczne. Morfologicznie identyczne rzęśistki występują u bydła, kotów i świń wywołując u tych zwierząt różne reakcje. *T. foetus* jest dobrze znanym czynnikiem etiologicznym zarazy rzęśistkowej bydła, wymienianej wśród głównych przyczyn bezpłodności i ronień u krów, a na początku tego wieku został także zidentyfikowany jako patogen powodujący długotrwałe i trudne do leczenia biegunki u kotów. Natomiast u świń występuje jako komensal (syn. *Trichomonas suis*), chociaż w 2017 r. odnotowano pierwszy przypadek „płucnej odmiany rzęśistkowicy” u prosięcia.

Szybki rozwój technik molekularnych umożliwiających namnażanie i sekwencjonowanie materiału genetycznego pozwala przypuszczać, że w najbliższym czasie poznamy dokładnie genomy rzęśistków i możliwe będzie poznanie mechanizmów zróżnicowanych reakcji *T. foetus* – żywicieli. Wprowadzanie nowoczesnych technik do rutynowej diagnostyki pozwala na podnoszenie czułości i swoistości testów wykorzystywanych do rozpoznawania i kontrolowania szerzenia się inwazji. Mając na uwadze powyższe stwierdzam, że tematyka pracy przedstawionej do recenzji wpisuje się w aktualny nurt badań światowych nad *T. foetus*.

Rozprawa doktorska mgr inż. Joanny Dąbrowskiej ma postać opracowania autorskiego, którego podbudowę stanowi spójny tematycznie cykl czterech publikacji opatrzonej wspólnym

tytułem „Występowanie oraz analiza genetyczna *Tritrichomonas foetus* w populacjach zwierząt wrażliwych”:

Praca przeglądowa

1. Dąbrowska J., Karamon J., Kochanowski M., Cencek T. „*Tritrichomonas foetus* as a causative agent of trichomonosis in different animal hosts” Journal of Veterinary Research. 2019, 63, 533-541.

Prace oryginalne

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

Sumaryczna punktacja prac znajdujących się w cyklu według MNISW wynosi 100, a współczynnik IF jest równy 9,721.

Doktorantka jest pierwszym autorem wszystkich publikacji w przedstawionym cyklu i autorem korespondencyjnym w jednej. Każda z publikacji zawiera informację, że jest to część rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Dąbrowskiej. Załączone do dysertacji oświadczenia współautorów prac wykazują indywidualny wkład Doktorantki przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej i opracowaniu interpretacji wyników tej pracy.

Treść dysertacji doktorskiej w formie opracowania przygotowanego w oparciu o wyżej wymieniony cykl publikacji liczy 39 stron. Zawartość, opatrzona spisem treści, została uporządkowana w rozdziałach: Wstęp, Cel i zakres pracy, Omówienie realizacji badań, Wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim. Kolejnymi jej elementami są: Piśmiennictwo oraz Publikacje (kopie) wchodzące w skład rozprawy doktorskiej.

W opracowaniu umieszczono informację dotyczącą źródeł finansowania badań z funduszy PIWET w ramach dwóch tematów statutowych: „Optymalizacja metod biologii molekularnej do identyfikacji *Tritrichomonas foetus*” i „Określenie różnicowania genetycznego *Tritrichomonas foetus* u zwierząt wrażliwych” oraz grantu szwajcarskiego Swiss

Government Excellence Scholarship for Foreign Students, Instytut Parazytologii, Uniwersytet w Bernie w ramach projektu pt. „Resequencing of *Tritrichomonas foetus* isolates from cat, cattle and pig”.

Wstęp, który Doktorantka podzieliła na podrozdziały, rozpoczyna ogólna charakterystyka obiektu badań zawierająca krótkie informacje historyczne i najnowsze, dotyczące morfologii i genetyki *T. foetus*. W następnym podrozdziale zatytułowanym „Występowanie „*Tritrichomonas foetus* u zwierząt wrażliwych” wyróżniono w opisie pozycje Bydło, Koty i Świnie. Znajdujemy w nich opis przebiegu inwazji oraz dane o rozpowszechnieniu.

Kolejny podrozdział zajmuje opis trzech metod diagnostycznych wykorzystywanych do identyfikacji pierwotniaka wraz z oceną ich czułości i użyteczności w badaniach różnego rodzaju materiału. Wstęp kończy podrozdział zatytułowany „Różnice i podobieństwa między rzęsistkami u różnych gospodarzy” zawierający informacje na temat aktualnego stanu wiedzy na temat badań genetycznych *T. foetus*.

Szesnastostronicowy Wstęp stanowi bardzo dobre wprowadzenie do części merytorycznych pracy i uzasadnia podjęcie badań. Został on opracowany z wykorzystaniem adekwatnych pozycji piśmiennictwa. Wyjątek stanowi strona nr 4, na której znalazłam kilka nieaktualnych już pozycji wykorzystanych jako źródło danych ilustrujących rozpowszechnienie rzęsistkowicy bydła w różnych krajach świata. Ponieważ porównywanie danych zebranych w różnych dekadach może zaburzyć obraz sytuacji epidemiologicznej uważam, że nieaktualne dane lepiej pominąć.

Celem pracy przedstawionej do recenzji była ocena występowania oraz analiza genetyczna *Tritrichomonas foetus* w populacjach zwierząt wrażliwych w Polsce. Zakres pracy określały trzy zadania szczególne obejmujące: opracowanie czulej i specyficznej metody do identyfikacji *T. foetus* u zwierząt wrażliwych i porównanie jej z metodami biologii molekularnej, analizę genetyczną szczepów rzęsiotka wyizolowanych od bydła, kota i świni oraz ocenę występowania *T. foetus* w populacjach bydła, kotów i świń w Polsce.

Kolejny rozdział opracowania zatytułowany „Omówienie realizacji badań” obejmujący syntetyczną prezentację materiałów, metodyki, wyników oraz ich podsumowanie skonstruowano z podziałem na zadania wyszczególnione w Celu pracy.

Zadanie nr 1 dotyczyło opracowania w oparciu o techniki molekularne czulego i swoistego testu identyfikacji *Tritrichomonas foetus* skutecznego w badaniu próbek kału kotów. Wynikiem przeprowadzonych badań była modyfikacja metody real-time PCR z zastosowaniem sond molekularnych do wykrywania fragmentów rDNA *T. foetus*, który dawał

wyniki fałszywie dodatnie przy obecności w próbce niepatogenicznego wiciowca *Simplicimonas*. Zastosowana modyfikacja pozwoliła wyeliminować wyniki nieswoiste, a czułość nowej metody pozwoliła na wykrywanie DNA w ilości odpowiadającej mniej niż jednemu rzęśistkowi. Drugi test opracowany do celów badań wykorzystujący technikę LAMP do wykrywania fragmentów genu kodującego β – tubulinę *T. foetus* posiadał porównywalną czułość. Warto podkreślić, że było to pierwsze w świecie zastosowanie tego markera do badań w kierunku rzęśistkowicy. Charakteryzujący się wysoką czułością test LAMP i prostotą wykonania może służyć jako praktyczne narzędzie do badań klinicznych i epidemiologicznych w laboratoriach nie dysponujących zaawansowanymi możliwościami technicznymi. Przy porównaniu czterech metod diagnostycznych dwie nowo opracowane techniki wykazywały wyższą czułość w badaniu próbek kału kota niż uprzednio opisywane testy.

Kolejne badania określone w celu pracy dotyczyły analizy genomu izolatów *T. foetus* uzyskanych od trzech różnych żywicieli. Zadanie to zrealizowano z zastosowaniem metody sekwencjonowania nowej generacji przy użyciu technologii Illumina HiSeq 3000. Uzyskane sekwencje izolatów bydłych, świńskich i kocich porównywano z genomem referencyjnym szczepu bydłego *T. foetus* z bazy GenBank. W wyniku analizy zidentyfikowano liczne polimorfizmy nukleotydowe oraz insercje i delecje występujące między badanymi szczepami. Liczba wariantów genetycznych wykrytych w genomie szczepu kociego w odniesieniu zarówno do szczepu bydłego jak i świńskiego była ponad 8 krotnie wyższa niż liczba różnic stwierdzonych pomiędzy genomem szczepu bydłego i świńskiego. Analiza wariantów fragmentów genetycznych mających wpływ na funkcję białka wykazała podobne różnice. Uzyskane wyniki mogły wskazywać na bliskie pokrewieństwo filogenetyczne szczepów bydłego i świńskiego podczas gdy szczep koci wydawał się być od nich genetycznie odległy. Doświadczalnie potwierdzono wyniki badań *in silico* uzyskując różnej wielkości fragmenty produktów amplifikacji dla DNA izolatów kocich i bydłych. Zidentyfikowane w pracy sekwencje zawierające polimorfizmy nukleotydowe oraz insercje i delecje mogą posłużyć jako markery w badaniach transmisji *T. foetus* wśród różnych gatunków żywicieli.

Ostatni etap pracy, w którym wykorzystano między innymi nowo opracowany test LAMP, stanowiły badania oceny rozpowszechnienia zarażenia u zwierząt wrażliwych w Polsce, w wyniku których wykryto zarażenie rzęśistkiem u 21% zbadanych kotów i 16% świń, nie stwierdzono natomiast obecności rzęśistka w próbach pobranych od bydła i dzików.

W rozdziale Wnioski znajdują się cztery punkty, niestety tylko pierwszy z nich odnoszący się do wyników badań nad nowymi testami diagnostycznymi jest zdefiniowany właściwie, a pozostałe należy uznać za podsumowanie uzyskanych wyników. Wnioski

wynikające z kolejnych badań znalazłam w Streszczeniu. Czy był to celowy zamysł Doktorantki? Jeżeli tak, to właściwa wydaje się zmiana nazwy rozdziału na Wyniki i wnioski.

Podsumowując stwierdzam, że spójny tematycznie cykl czterech publikacji większościowego współautorstwa mgr inż. Joanny Dąbrowskiej jest oryginalnym i wartościowym opracowaniem dotyczącym oceny występowania i analizy genetycznej *Tritrichomonas foetus* w Polsce w populacjach zwierząt. Opracowanie to w istotny sposób przyczynia się do udoskonalenia testów do rozpoznawania rzęsistkowicy, które mogą znaleźć zastosowanie zarówno w badaniach klinicznych jak i epidemiologicznych. Przeprowadzone badania zawierają elementy nowatorskie i zostały przeprowadzone z zastosowaniem metod właściwych dla tego typu badań. Przy ich wykonywaniu i opracowywaniu wyników Doktorantka wykazała się odpowiednią wiedzą merytoryczną i umiejętnością samodzielnej pracy naukowej.

We wniosku końcowym stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska „Występowanie oraz analiza genetyczna *Tritrichomonas foetus* w populacjach zwierząt wrażliwych” jest oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego i stanowi wartościowy dorobek naukowy mgr inż. Joanny Dąbrowskiej. Rozprawa ta spełnia warunki stawiane pracom doktorskim określone w Ustawie o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U. Nr 65, poz. 595 ze zm.). Biorąc powyższe pod uwagę, przedstawiam Wysokiej Radzie Państwowego Instytutu Weterynaryjnego wniosek o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Joanny Dąbrowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Mając na uwadze znaczące osiągnięcia poznawcze i aplikacyjne pracy doktorskiej mgr inż. Joanny Dąbrowskiej, a także będący jej wynikiem istotny dorobek publikacyjny składam wniosek o wyróżnienie tej pracy.

