

Dr hab. Krzysztof Tomczuk prof. nadzw. UP
Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin 14.03.2018

RECENZJA

dysertacji doktorskiej Pani mgr **Agnieszki Kaupke**

pt. „*Inwazje Cryptosporidium u zwierząt gospodarskich, identyfikacja gatunków pasożyta przeprowadzona na podstawie analizy polimorfizmu markerów genetycznych*”

wykonanej pod kierunkiem naukowym dr hab. Artura Rzeżutki prof. nadzw.

w Zakładzie Wirusologii Żywności i Środowiska

Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowy Instytut Badawczy

w Puławach

Zmiany zachodzące w hodowli zwierząt gospodarskich przejawiające się jej masowym charakterem generują występowanie nowych zagrożeń, w tym również związanych z kontaminacją środowiska różnorodnymi patogenami. Wyjątkowo aktualnym przykładem tego typu zagrożeń jest kryptosporydioza. Będąc pasożytem o charakterze zoonotycznym zyskuje na znaczeniu zarówno w odniesieniu do zwierząt jak i człowieka. Kryptosporydia są pierwotniakami o relatywnie niskim potencjale patogennym, przez co ich inwazje są często bagatelizowane. Opisywane jako patogeny fakultatywne nie mające dużego znaczenia klinicznego dla przeważającej części populacji ludzi i wielu gatunków zwierząt. W tym świetle szczególne zagrożenie występuje jedynie wobec osobników z niedojrzałymi komórkami efektorowymi (np enterocyty) lub zaburzeniami systemu immunologicznego. Jest ono najbardziej aktualne wobec osobników bardzo młodych lub w podeszłym wieku a także z nabytymi zaburzeniami odpowiedzi immunologicznej lub będących w fazie immunosupresji. We wszystkich przypadkach ma to związek z zaburzeniem odpowiedzi immunologicznej u potencjalnych żywicieli w wyniku spadku odsetka limfocytów CD4. Do wzrostu zainteresowania kryptosporydiozą u ludzi przyczynił się gwałtowny rozwój pandemii AIDS, w której przebiegu zarażenia oportunistyczne stają się znaczącym problemem klinicznym. Również wielkim echem odbiła się największa, obejmująca setki tysięcy ludzi, wodnopochozna epidemia kryptosporydiozy w Milwaukee (USA) w 1993 roku,

z wieloma przypadkami śmiertelnymi wśród osób z niedoborami immunologicznymi. Od tego czasu zainteresowanie świata naukowego kryptosporydiozą wzrasta, co odzwierciedla się rosnącą liczbą stwierdzanych inwazji u ludzi i zwierząt. Z uwagi na umasowienie hodowli zwierząt gospodarskich (częsty rezerwuar inwazji) rosnące zagrożenie stwierdza się również i w Polsce. Dotyczy to przede wszystkim sąsiedztwa dużych ferm, gdzie woda i gleba ulega kontaminacji formami inwazyjnymi. Inwazja ta to także problem weterynaryjny, głównie ekonomiczny, szczególnie wobec młodych zwierząt (osesków) utrzymywanych w zagęszczeniu. Z tego względu wybór tematu pracy doktorskiej uważam za wyjątkowo trafny.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma formę jednotematycznego zbioru opublikowanych oryginalnych artykułów naukowych. W skład recenzowanej pracy wchodzi pięć artykułów opublikowanych w polskich i zagranicznych czasopismach naukowych w latach 2014-2017:

1. Kaupke A., Rzeżutka A.: Epidemiologia inwazji *Cryptosporidium parvum* u zwierząt gospodarskich i wolno żyjących. *Med. Weter.* 2017, 73, 387-394.
2. . Kaupke A., Kwit E., Chalmers R. M., Michalski M. M., Rzeżutka A.: An outbreak of massive mortality among farm rabbits associated with *Cryptosporidium* infection. *Res. Vet. Sci.* 2014, 97, 85-87.
3. Kaupke A., Rzeżutka A.: Emergence of novel subtypes of *Cryptosporidium parvum* in calves in Poland. *Parasitol. Res.* 2015, 114, 4709-4716.
4. Kaupke A., Michalski M.M., Rzeżutka A.: Diversity of *Cryptosporidium* species occurring in sheep and goat breeds reared in Poland. *Parasitol. Res.* 2017, 116, 871-879.
5. . Kaupke A., Gawor J., Rzeżutka A., Gromadka R.: Identification of pig-specific *Cryptosporidium* species in mixed infections using Illumina sequencing technology. *Exp. Parasitol.* 2017, 182, 22-25.

Wszystkie prace są opracowaniami wieloautorskimi w których doktorantka jest pierwszym autorem. Wszystkie prace opublikowano w czasopismach z listy *Journal Citation Report* (JCR). Sumaryczny czynnik wpływu (IF) wynosi 7,65 a łączna liczba punktów dla czasopism z bazy MNiSW, wynosi 135. Spośród załączonych prac jedna jest artykułem przeglądowym (1), a cztery pozostałe to prace oryginalne, w których przedstawiono wyniki badań własnych. Wszystkie prace poświęcone są zagadnieniom związanym z występowaniem, diagnostyką i różnicowaniem molekularnym zarażeń pierwotniakami

z rodzaju *Cryptosporidium* u zwierząt. Dobór publikacji w cyklu jest bardzo logiczny, zgodny z postawionymi celami pracy doktorskiej i w pełni uzasadniony merytorycznie. Z uwagi na potencjalnie zoonotyczny charakter inwazji prace mają duże znaczenie sanitarno-epidemiologiczne.

Opracowanie stanowiące rozprawę doktorską liczy 49 stron maszynopisu oraz kopie opublikowanych prac. Poza stroną tytułową zawiera podziękowania, oświadczenia autora i promotora, spis treści, wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, wykaz skrótów, obszerny wstęp będący uzasadnieniem kierunku podjętych badań, przedstawienie celów przyświecających całemu cyklowi badań, rozdział dotyczący zastosowanej metodyki, syntetyczną prezentację wyników poszczególnych etapów badań, sformułowane wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz bogate piśmiennictwo.

We wstępie doktorantka zawarła liczne podrozdziały dotyczące m.in. badań nad *Cryptosporidium* spp. w ujęciu historycznym, przedstawiła szczegółowo cykl rozwojowy pierwotniaka, dokonała analizy inwazji *Cryptosporidium* spp. i kryptosporydiozy u zwierząt gospodarskich. Następnie zaakcentowała aspekty epidemiologii inwazji powodowanych przez *Cryptosporidium* spp. u zwierząt gospodarskich w Polsce oraz przedstawiła zoonotyczny charakter inwazji. Kolejne podrozdziały zawierają rozważania dotyczące molekularnej diagnostyki inwazji a szczególnie: wykrywania i identyfikacji gatunków *Cryptosporidium* spp. na podstawie analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) DNA, identyfikacji subgenotypów *Cryptosporidium* spp. przeprowadzonej na podstawie analizy polimorfizmu mikro- i minisatelitarnego DNA, identyfikacji subgenotypów *Cryptosporidium* spp. przeprowadzonej na podstawie analizy sekwencyjnej genów podstawowego metabolizmu pasożyta (MLST), genotypowania metodą spektrometrii mas z jonizacją laserem wspomaganą matrycą (MALDI-TOF MS), polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP), oraz nowoczesnej metody sekwencjonowania DNA.

Cele badań w liczbie 5 zostały zdefiniowane w sposób jasny i zrozumiały. Mają one uzasadnienie w rozważaniach zaprezentowanych we "Wstępie" dysertacji doktorskiej.

W rozdziale poświęconym metodyce autorka prezentuje informacje dotyczące liczby pobranych prób, gatunków zwierząt objętych badaniami, ich wieku, statusu inwazjologicznego oraz rozprzestrzenienia terytorialnego. Następnie wyjaśnia sposób ekstrakcji materiału genetycznego oraz trzy zakresy analizy fragmentów genomu pierwotniaka obejmujące małą podjednostkę rybosomalną 18S rRNA, gen kodujący białko tworzące ścianę komórkową oocysty *Cryptosporidium*(COWP) oraz fragment genomowego

DNA *C. parvum* (Lib13). Autorka przedstawia również dwa sposoby identyfikacji amplifikowanych sekwencji w postaci cięć enzymami restrykcyjnymi oraz użycia metody sekwencjonowania nowej generacji (NGS). Następnie autorka prezentuje zastosowane analizy statystyczne z wyszczególnieniem zastosowanych testów w załączonych pracach badawczych.

Kolejny rozdział dysertacji poświęcony jest analizie wyników prac doświadczalnych. W kolejności zamieszczonych kopii publikacji analizowane są ich najważniejsze tezy. Swego rodzaju wstępem do problematyki prac doświadczalnych jest praca przeglądowa dokumentująca doskonałą znajomość zagadnienia dotyczącego występowania zagrożenia kryptosporydiozą u ludzi zwierząt. Na podstawie syntetycznej analizy epidemiologii inwazji *Cryptosporidium parvum* u zwierząt gospodarskich i wolno żyjących doktorantka wskazuje na duże zróżnicowanie szczepów szczególnie patogenności dla poszczególnych żywicieli oraz możliwości transmisji między nimi. Dzięki zastosowaniu analizy molekularnej możliwa jest nie tylko identyfikacja subgenotypu ale także śledzenie dróg transmisji pasożyta, oraz identyfikacja źródła zarażenia. Doktorantka analizując najnowsze opublikowane doniesienia w tej dziedzinie wnioskuje iż obecnie jedynie badania molekularne są podstawą nowoczesnej diagnostyki i dochodzenia epizootyczno-epidemiologicznego. Ich wykorzystanie przyczyni się do skutecznego zapobiegania kryptosporydiozie w rozumieniu epidemiologicznym.

Prace doświadczalne przedstawiają wyniki własnych badań i dotyczą różnicowania molekularnego inwazji występujących u królików, bydła, owiec i kóz oraz świń. Badania przeprowadzono na obszernym materiale badawczym. Kał pozyskano od młodych zwierząt, będących grupą ryzyka, o zróżnicowanym statusie klinicznym z terenu całej Polski

W publikacji "*An outbreak of massive mortality among farm rabbits associated with Cryptosporidium infection* (Research in Veterinary Science 2014) doktorantka opisuje identyfikację gatunku *Cryptosporidium cuniculus* metodami molekularnymi wykorzystującymi geny kodujące małą podjednostkę rybosomalną 18S rRNA (849 par zasad) oraz gen kodujący białko tworzące ścianę komórkową oocysty *Cryptosporidium*. (640 par zasad). Identyfikacji gatunku dokonała za pomocą cięć enzymami restrykcyjnymi. W efekcie wykazała, że za ciężki przebieg inwazji z 300 upadkami wśród zarażonych królików odpowiada nowy szczep *Cryptosporidium cuniculus* o subgenotypie VbA24 C.

W kolejnej pracy przeprowadziła molekularną identyfikację subgenotypów *Cryptosporidium parvum* występujących u bydła w Polsce, wraz z oceną stopnia zjadliwości poszczególnych szczepów. Poza identyfikacją dwu wcześniej przytaczanych regionów, różnice w obrębie genomu analizowano dodatkowo metodą PCR obejmując

zainteresowaniem sekwencje fragmentu genomowego DNA *C. parvum* (Lib13). Identyfikacji sekwencji dokonano za pomocą cięć enzymami restrykcyjnymi oraz poprzez sekwencjonowanie. Spośród 14 zidentyfikowanych subgenotypów *C. parvum* stwierdzono nowe, dotychczas nie wykrywane u bydła w Europie szczepy. Określono przedział wiekowy o największej wrażliwości cieląt - do 2 tygodnia życia. Wśród potwierdzonych szczepów określono najbardziej patogenne. Dokonując analizy sekwencji porównano je do opisanych w literaturze szczepów szczególnie patogennych dla ludzi. Wykazano ich obecność badanych próbach co potwierdza występowanie ryzyka zarażenia ludzi na fermach i w ich okolicy.

Kolejna praca dotyczy analizy molekularnej inwazji *Cryptosporidium spp.* u owiec i kóz. Wykorzystując prezentowaną wcześniej metodykę badano przebieg inwazji w obrębie różnych ras, oraz w różnych grupach wiekowych. Doktorantka stwierdziła nosicielstwo 5 różnych gatunków z dominacją gatunku *Cryptosporidium xiaoi* i możliwością występowania inwazji mieszanych nawet do trzech gatunków. Nie stwierdzając objawów klinicznych, doktorantka potwierdziła małą wrażliwość owiec i kóz na zarażenie. Jednocześnie potwierdziła występowanie szczepów szczególnie patogennych dla człowieka stwierdzanych także u bydła.

Ostatnia z cyklu prac dotyczy analizy inwazji *Cryptosporidium* u świń i zastosowaniu nowoczesnej techniki identyfikacji analizy sekwencji – sekwencjonowanie nowej generacji (NGS). Analizując gen małej podjednostki rybosomalnej 18S rRNA oraz gen kodujący białko tworzące ścianę komórkową oocysty (COWP) amplifikowane z materiału izolowanego z kału zarażonych świń z pomocą NGS wykazano obecność inwazji mieszanych z możliwością bezpośredniej identyfikacji obu gatunków. U świń potwierdzono występowanie *C. suis* i *C. scrofarum*. Zastosowana metoda NGS pozwoliła na prawidłową identyfikację gatunków pasożyta przypadkach dotyczących próbek zawierających niewielką koncentrację podobnych matryc DNA.

Na podstawie przeprowadzonych badań Autorka wysnuła 6 wniosków korespondujących do celów badań i znajdujących swe uzasadnienie w uzyskanych wynikach doświadczenia. Sprowadzają się one do stwierdzenia, że badania molekularne są niezastąpionym narzędziem w identyfikacji poszczególnych szczepów i gatunków pierwotniaków z rodzaju *Cryptosporidium* zarówno w diagnostyce parazytologicznej jak i dochodzeniu epizootycznym. Ich zastosowanie pozwoliło na wykazanie znaczącej roli zwierząt gospodarskich w rozprzestrzeleniu szczepów zoonotycznych stwarzających zagrożenie dla zdrowia człowieka.

Nie wnoszę żadnych zastrzeżeń do wartości merytorycznej pracy. W tej kategorii oceniam ją bardzo wysoko. Opracowanie przedstawione jest w sposób zrozumiały, czytelny i układa się w logiczną całość.

Z obowiązku recenzenta pragnę jednak zwrócić uwagę na niewielkie nieścisłości, głównie techniczne dostrzeżone w pracy np.:

We wstępie str 5 wiersz 8 autor pisze; „kryptosporydiozę u małych przeżuwaczy rozpoznano w 1981 roku (Barker i Carbonell, 1974; Mason i wsp., 1981)” czy praca 1974 roku nawiązuje do odkrycia z roku 1981.

W rozdziale 1.2 str 7 wiersz 14 autor opisuje cykl rozwojowy; „obejmuje on proces rozmnażania płciowego i bezpłciowego, który zakończony jest tworzeniem form dyspersyjnych pasożyta” proponuję zamienić kolejność . w cyklu rozwojowym w pierwszej kolejności zachodzi rozmnażanie bezpłciowe, następnie płciowe którego konsekwencją jest tworzenie oocyt będących formami dyspersyjnymi pasożyta.

W rozdziale 1.2 str 8 wers 2. dotyczy opisu kolonizacji enterocytów; „.....sporozoity, które aktywnie wnikają do enterocytów. W komórkach nabłonka przekształcają się one w trofozoity.....” wg aktualnych poglądów różnica z innymi kokcydiami polega na tym, iż sporozoity nie wnikają do cytoplazmy enterocytów . W górnej strefie komórki tworzą swego rodzaju „wakuolę parazytologiczną” której ścianą jest fragment błony komórkowej enterocyta. We wspomnianych wakuolach zachodzi rozmnażanie bezpłciowe a w następnym etapie w kolejnych wakuolach na kolejnych enterocytach płciowe. Uwalnianie się merontów oraz oocyt nie powoduje uszkodzenia enterocyta a tylko pęknięcie wakuoli, co warunkuje niepatogenność wielu inwazji. Niedojrzałość nabłonka jelitowego noworodków powoduje, że w tej grupie wiekowej inwazje przebiegają z największymi uszkodzeniami.

W rozdziale Materiał i Metody na stronie 21 Doktorantka stwierdziła; „Do badań pobrano 472 próbki kału bydła, owiec, kóz, królików i świń. W załączonych pracach wyszczególniono jako materiał badawczy próby od 6 zajęcy, 689 cieląt 234 owiec, 105 kóz oraz min. 63 świń (taki nr posiada ostatnia próba dodatnia) co w sumie daje liczbę 1097 , proponuje uściślić tę niezgodność.

Powyższe uwagi nie umniejszają wartości naukowej ocenianej dysertacji, mają głównie charakter uwag redakcyjnych i są do wiadomości autora.

Pracę doktorską mgr Agnieszki Kaupke oceniam bardzo wysoko. Doktorantka w pełni zrealizowała postawione w założeniach pracy cele i wyciągnęła właściwe wnioski. Wielkim atutem cyklu prac jest ich ponadregionalny a wręcz globalny wymiar oraz aplikacyjny charakter. Informacje i wnioski będące efektem opisywanych badań, będą mogły znaleźć

zastosowanie w opracowywaniu strategii przeciwdziałania epidemiom w dobie masowej hodowli. Zarówno dobór metod badawczych jak też interpretacja wyników badań własnych w konfrontacji z licznie cytowanymi pracami innych autorów świadczą o dojrzałości naukowej Autorki. Rozprawa doktorska mgr Agnieszki Kaupke wnosi nowe, oryginalne wartości poznawcze i poszerza ogólnie dostępną wiedzę nie tylko na temat różnorodności gatunkowej pierwotniaków z rodzaju *Cryptosporidium* ale także pozwala na przewidywanie zagrożeń dla ludzi i zwierząt wynikających ze zróżnicowania poziomu patogenności wielu nowo odkrytych szczepów. Dynamiczny rozwój badań molekularnych (włącznie z udziałem recenzowanych prac) pozwala na weryfikację dotychczasowych poglądów nie tylko z zakresu taksonomii ale również epizotiologii i epidemiologii.

Przedstawiona do oceny praca jest samodzielnym, oryginalnym i wartościowym dorobkiem naukowym mgr Agnieszki Kaupke, o dużych wartościach naukowo-poznawczych oraz aplikacyjnych i moim zdaniem odpowiada w pełni warunkom określonym w art. 13 Ustawy 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), a także zapisom 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 postępowaniu o nadanie tytułu profesora. Biorąc powyższe pod uwagę przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie mgr Agnieszki Kaupke do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Bardzo wysoka ocena pracy, uwzględniająca przede wszystkim aktualność wyboru tematu, innowacyjność zastosowanych metod, oraz rzetelność badań zredagowanych w przedstawionej dysertacji, upoważnia mnie do wystąpienia do Wysokiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach o wyróżnienie pracy doktorskiej stosowną nagrodą.

Lublin, dnia 22. 03. 2018 r.

dr hab. Krzysztof Tomczuk prof. UP Lublin

dr hab. Krzysztof Tomczuk
prof nadzw. UP