

### Ocena

**rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Kaupke pt. "Inwazje *Cryptosporidium* u zwierząt gospodarskich, identyfikacja gatunków pasożyta przeprowadzona na podstawie analizy polimorfizmu markerów genetycznych"**

Przedmiotem ocenianej rozprawy są pierwotniaki z rodzaju *Cryptosporidium*, szeroko rozprzestrzenione pasożyty zwierząt i ludzi. Pasożyt opisany został w 1907 r. przez Tyzzeria, który stwierdził jego obecność w gruczołach żołądka myszy. Od tego czasu występowanie pierwotniaków z rodzaju *Cryptosporidium* wykazano u ponad 170 gatunków kregowców. Pasożyty te wywołują u zwierząt choroby układu pokarmowego przebiegające z objawami biegunki. Pierwotniaki są potencjalnymi patogenami zoonotycznymi, ponieważ niektóre gatunki występują zarówno u zwierząt i ludzi i mogą być między nimi przenoszone. Jakkolwiek badania nad występowaniem tych pierwotniaków były prowadzone w kilku ośrodkach badawczych w kraju, były to w większości przypadków prace oparte na mikroskopowej identyfikacji oocyst pasożyta lub testach immunoenzymatycznych, często bez określenia gatunku odpowiedzialnego za inwazję. Dlatego też z uznaniem należy przyjąć wybór tematu rozprawy doktorskiej i podjęcie przez mgr Agnieszkę Kaupke badań nad występowaniem pierwotniaków z rodzaju *Cryptosporidium* u zwierząt gospodarskich oraz identyfikacją gatunków i subgenotypów pasożyta przy użyciu analizy polimorfizmu markerów genetycznych. Są to jedne z nielicznych w skali kraju badania nad tym pasożytem, przeprowadzone przy użyciu tak nowoczesnych metod. Wyniki tych badań są cennym uzupełnieniem

luk istniejących w dotychczasowej wiedzy dotyczącej epidemiologii tego pierwotniaka.

Rozprawa doktorska mgr Agnieszki Kaupke stanowi spójny tematycznie cykl pięciu publikacji opatrzonych wspólnym tytułem “Inwazje *Cryptosporidium* u zwierząt gospodarskich, identyfikacja gatunków pasożyta przeprowadzona na podstawie analizy polimorfizmu markerów genetycznych”.

W przedstawionym cyklu opublikowanym w latach 2014-2017 cztery prace ukazały się w postaci prac oryginalnych, i jedna jako artykuł przeglądowy. Cztery prace oryginalne opublikowano w języku angielskim w czasopismach znajdujących się w bazie JCR: pojedyncze prace w *Research in Veterinary Science* i *Experimental Parasitology* oraz dwie w *Parasitology Research*. Praca przeglądowa w języku polskim ukazała się w czasopiśmie *Medycyna Weterynaryjna*. Współczynnik wpływu (Impact Factor – IF) tych publikacji waha się od 0,161 do 2,329 a liczba punktów MNiSW od 15 do 35 Sumaryczny IF tych prac wynosi 7,65, a łączna liczba punktów według MNiSW – 135.

Dwie prace są dwuautorskie, a trzy wieloautorskie, we wszystkich Doktorantka jest pierwszym autorem, a Jej wkład pracy w ich powstanie wahał się od 60 do 70%, co potwierdzają załączone oświadczenia. Jest to dowodem wiodącej roli Doktorantki w opracowaniu koncepcji i wykonaniu badań, interpretacji uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptów.

Opracowanie zawierające wymieniony cykl publikacji stanowiące rozprawę doktorską liczy 50 stron maszynopisu, i zawiera poza stroną tytułową i podziękowaniami następujące elementy i rozdziały: Oświadczenia promotora i autora pracy, Spis treści, Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską, Wykaz skrótów, Wstęp, Cele pracy, Materiał i metody, Omówienie głównych wyników prac doświadczalnych, Wnioski, Streszczenia w językach polskim i angielskim, Piśmiennictwo oraz publikacje stanowiące rozprawę doktorską. Do rozprawy dołączone są oświadczenia Doktorantki i współautorów.

W obszernym „Wstępie” liczącym 15 stron Autorka opisała historię badań nad *Cryptosporidium* spp., przedstawiła charakterystykę przedmiotu badań – pierwotniaków z tego rodzaju, cykl rozwojowy pasożyta, występowanie u zwierząt gospodarskich na świecie, jego prevalencję na terenie kraju oraz znaczenie kryptosporydiozy jako zoonozy. Omówiła również molekularne metody diagnostyki inwazji: wykrywania i identyfikacji gatunków *Cryptosporidium* spp. na podstawie analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) DNA, identyfikacji subgenotypów na podstawie analizy polimorfizmu mikro- i minisatelitarnego DNA i analizy sekwencyjnej genów podstawowego metabolizmu pasożyta (MLST), genotypowania metodą spektrofotometrii mas z jonizacją laserem wspomaganą matrycą (MALDI-TOF MS), a także polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP) oraz metody sekwencjonowania DNA.

W drugim, jednostronicowym rozdziale Autorka sformułowała cele pracy, które obejmowały: molekularne badania inwazji *Cryptosporidium* spp. u wybranych gatunków zwierząt gospodarskich w Polsce, gatunkową identyfikację tych pierwotniaków w przypadkach zarażeń mieszanych owiec i kóz, ocenę epidemiologii zarażeń *C. parvum* w krajowej populacji bydła i małych przeżuwaczy na podstawie analizy polimorfizmu mikrosatelitarnego DNA pasożyta, ocenę występowania i rozpowszechnienia zoonotycznych gatunków *Cryptosporidium* spp. u zwierząt gospodarskich oraz zastosowanie metody NGS do identyfikacji gatunków pierwotniaka przy zarażeniach mieszanych u świń.

W świetle przedstawionych we wstępie danych podjęcie tych badań było w pełni uzasadnione. Na uznanie zasługuje szeroki zakres planowanych badań i ich kompleksowy charakter.

W trzecim rozdziale „Materiał i metody” obejmującym dwie strony omówiono w syntetycznej formie wykorzystany materiał badawczy i użyte metody. Łącznie badaniom poddano 472 próbki kału bydła owiec, kóz, królików

i świń z gospodarstw z terenu całej Polski. Próbki pochodziły od młodych zwierząt, w wieku do 9 tygodnia życia. Były to zwierzęta zdrowe, zarażone bezobjawowo oraz wykazujące objawy biegunki. Jest to bardzo bogaty materiał badawczy, pozwalający na wykonanie szerokich, kompleksowych badań. Autorka opisała również przeprowadzone analizy molekularne oraz testy zastosowane w analizie statystycznej. Dobór metod zastosowanych w ocenianej pracy jest właściwy i nie budzi zastrzeżeń. Szczegóły metodyczne, wyniki badań i dyskusja zawarte są w publikacjach stanowiące rozprawę doktorską.

Kolejny rozdział o objętości czterech stron „Omówienie głównych wyników prac doświadczalnych” obejmuje syntetyczną prezentację uzyskanych w poszczególnych pracach wyników wraz z ich krytyczną analizą na tle światowego piśmiennictwa.

Z przeprowadzonych badań Doktorantka wyciągnęła sześć wniosków, które w pełni pokrywają zaplanowany zakres badań i dowodzą wykonania założonych celów badawczych.

Opracowanie kończą streszczenia w wersji polskiej i angielskiej oraz obszerny spis literatury przedmiotu obejmujący 191 pozycji odpowiednio dobranego i pełnego piśmiennictwa krajowego i zagranicznego. Wykorzystanie tak licznych pozycji piśmiennictwa dowodzi, że Autorka bardzo dobrze opanowała teoretyczne podstawy zagadnienia.

Na końcu opracowania umieszczono kopie publikacji stanowiących rozprawę doktorską.

Tematyka publikacji stanowiących rozprawę doktorską jest merytorycznie spójna i dotyczy:

1. Opisanie pierwszego w Polsce przypadku kryptosporidiozy u królików na terenie fermy wielkotowarowej przebiegającej z masowymi upadkami zwierząt oraz wykrycia nowego subgenotypu *C. cuniculus*.

2. Molekularnej identyfikacji subgenotypów *C. parvum* występujących w populacji bydła w Polsce oraz próba oceny zjadliwości szczepów pasożyta na podstawie objawów klinicznych występujących u zarażonych zwierząt.

3. Molekularnych badań inwazji *Cryptosporidium* spp. u różnych ras kóz hodowanych w Polsce, określenia prewalencji zarażeń pasożytem, zidentyfikowania gatunków pierwotniaków, a także ustalenia zależności pomiędzy wiekiem badanych zwierząt, ich rasą, a częstością występowania inwazji.

4. Identyfikacji gatunków *Cryptosporidium* w przypadkach zarażeń mieszanych u świń za pomocą metody NGS.

Szeroki zakres badań dotyczący ważnych zagadnień epidemiologicznych został umiejętnie określony, badania dobrze zaplanowane i konsekwentnie wykonane przy użyciu odpowiednich, nowoczesnych metod. Doktorantka uzyskała bardzo interesujące i wartościowe wyniki o znaczeniu zarówno poznawczym jak i aplikacyjnym.

Do najważniejszych wyników rozprawy należy molekularna identyfikacja występujących u bydła subgenotypów *C. parvum* z rodzin genetycznych IIa, IIc i III, a także wykrycie nowych szczepów IIaA10G1R1 i IIIA19R3, które dotychczas nie były zarejestrowane u tego gatunku żywiciela w Europie.

Cenne z metodycznego punktu widzenia jest również stwierdzenie, że metoda sekwencjonowania nowej generacji pozwoliła na identyfikację gatunków *C. suis* i *C. scrofarum* w przypadku zarażeń mieszanych występujących u świń oraz na analizę próbek zawierających niewielką koncentrację podobnych matryc DNA.

Istotnym osiągnięciem było ustalenie składu gatunkowego i prewalencji *Cryptosporidium* spp. u owiec i kóz: *C. bovis*, *C. ubiquitum*, *C. hominis*, *C. parvum* i *C. xiaoi* oraz stwierdzenie, że w populacji tych zwierząt dominowały zarażenia wywołane ostatnim z wymienionych gatunków

Ważne jest także wykazanie, że zwierzęta gospodarskie są rezerwuarem zoonotycznych (*C. parvum*, *C. cuniculus*, *C. suis*, *C. ubiquitum*) i antroponotycznych (*C. hominis*) gatunków pasożyta.

Bardzo interesujące jest opisanie pierwszego przypadku kryptosporydiozy w wielkotowarowej fermie królików, przebiegającego z masowymi upadkami zwierząt, i zidentyfikowanie jej czynnika etiologicznego - nowego subgenotypu VbA24 *C. cuniculus*.

Wyniki te mają znaczny aspekt praktyczny w kontekście epidemiologii i profilaktyki kryptosporydiozy u zwierząt gospodarskich i ludzi.

Pod względem formalnym rozprawa mgr Agnieszki Kaupke nie budzi zastrzeżeń. Należy uznać za w pełni prawidłowe zarówno układ treści, wyciągnięcie wniosków w oparciu o przedstawioną dokumentację, a także wykorzystanie źródeł.

Rozprawę Doktorantka opracowała sumiennie i wnikliwie w oparciu o prawidłową metodykę badań. Należy uznać, że wytyczone cele pracy zostały osiągnięte w stopniu w pełni zadawalającym.

Recenzowana dysertacja wykazując staranność wykonanych badań, samodzielność obserwacji i wnioskowania, a zatem pełne przygotowanie i dojrzałość jej Autorki do prowadzenia prac naukowych, pod każdym względem odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim.

Dlatego też z pełnym przekonaniem przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego wnioski o dopuszczenie mgr Agnieszki Kaupke do dalszych, przewidzianych ustawą etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na nowatorstwo wykonanych badań, doskonałe opracowanie rozprawy, a zwłaszcza ze względu na wysoką wartość uzyskanych wyników proponuję wyróżnienie ocenianej dysertacji i przyznanie mgr Agnieszce Kaupke nagrody.

