



Warszawa, dnia 18 czerwca 2025 r.

Dr hab. Anna Maria Pyziel, prof. SGGW
Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Prof. dr hab. Andrzej Koncicki
Przewodniczący Rady Naukowej Państwowego Instytutu
Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w
Puławach

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. wet. Katarzyny Krasoń pt. „Badanie mikrobiomu i wiromu rodzimych gatunków *Culicoides* spp.”

**wykonanej w Zakładzie Wirusologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego -
Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach**

**pod kierunkiem prof. dr hab. Magdaleny Larskiej oraz opieką promotora pomocniczego
dr Wojciecha Rożka**

Zgodnie z uchwałą Nr 12/PIWet-PIB/2025 z dnia 24 kwietnia 2025 r. Rady Naukowej PIWet-PIB oraz w oparciu o Ustawę z dnia 20.07.2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2024, poz. 1571) dokonałam recenzji pracy doktorskiej lek. wet. Katarzyny Krasoń pt.: „Badanie mikrobiomu i wiromu rodzimych gatunków *Culicoides* spp.”.

Ocenianą rozprawę doktorską stanowi **monografia naukowa** napisana przez Doktorantkę w 2024 r., dotycząca wykrywania patogenów przenoszonych przez muchówki z rodziny kuczmanowatych.

Złożona do oceny rozprawa doktorska liczy 152 strony i składa się z 7 rozdziałów. Układ redakcyjny ocenianej dysertacji spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Rozpoczyna ją strona tytułowa, podziękowania i oświadczenia Promotora i Autora rozprawy. Streszczenia w języku polskim i angielskim można znaleźć na str. 7-10.



Spis treści rozprawy umieszczono na str. 11-13.

Skróty użyte w treści rozprawy wykazano na str. 15.

Na str. 17-44 można znaleźć Wstęp (rozdz. 1), który został podzielony na 5 podrozdziałów dotyczących ogólnej charakterystyki *Culicoides* spp., kompetencji i pojemności wektorowej owadów, dróg i cykli transmisji wirusów przenoszonych przez stawonogi, czynników chorobotwórczych przenoszonych przez *Culicoides* spp. oraz zasad analizy genetycznej materiału biologicznego pobranego bezpośrednio z próbki środowiskowej (metagenomika).

Cel pracy (rozdz. 2) przedstawiono na str. 45. Kolejno na str. 47-65 opisano Materiały i metody (rozdz. 3) wyodrębniając 6 podrozdziałów dotyczących materiału badawczego, przygotowania próbek do analizy mikrobiomu bakteryjnego, przygotowania próbek do analizy mikrobiomu/wiromu, analizy metataksonomicznej genu 16S, analizy metagenomicznej i wyposażenia zastosowanego do badań.

Wyniki badań (rozdz. 4) opisano na str. 67-110, wyodrębniając 2 podrozdziały dotyczące stężenia DNA/RNA i współczynników czystości oraz analizy metataksonomicznej i metagenomicznej bakteryjnego genu 16S.

Na str. 111-130 rozprawy przestawiono Dyskusję nad uzyskanymi wynikami (rozdz. 5) w kontekście doniesień innych autorów.

Kolejno na str. 131 przedstawiono 9 wniosków płynących z pracy (rozdz. 6).

Na str. 133-152 wymieniono 334 pozycje piśmiennictwa (rozdz. 7).

Problem naukowy, jego sformułowanie i aktualność podjętego zagadnienia naukowego

Muchówki z rodzaju *Culicoides* z rodziny kuczmanowatych są jednymi z najmniejszych owadów krwio pijnych na świecie. Owady te cechuje szeroki zasięg geograficzny, jednak najwięcej danych na ich temat pochodzi z Azji, Afryki i Ameryki Południowej, gdzie od wieków poznane są jako wektory patogenów endemicznych. Aktywności tych owadów sprzyja wysoka wilgotność i temperatura powietrza 18-29°C, stąd ich największą aktywność notuje się w strefach klimatu tropikalnego i subtropikalnego. Z różnych gatunków muchówek z rodzaju *Culicoides* wyizolowano ponad 70 arbowirusów należących do rodzin Rhabdoviridae, Bunyaviridae i Reiviridae. Należą do nich między innymi wirusy z rodzaju *Orbivirus*, takie jak wirus afrykańskiego pomoru koni (AHSV), wirus choroby krwotocznej zwierzyny płowej (EHDV), wirus choroby niebieskiego języka (BTV), czy wirus Ibaraki (IBAV), będący czynnikiem etiologicznym choroby przypominającej BT. Oprócz tego muchówki z rodzaju *Culicoides* są odpowiedzialne za przenoszenie wirusów z rodzaju *Orthobunavirus* takich jak wirus Schmallenberg (SBV) czy wirus Akabane, które są wirusami chorobotwórczymi dla przeżuwaczy. Innym przykładem jest wirus choroby guzowatej skóry bydła (LSDV) z rodzaju *Capripoxvirus*. Nie można pominąć znaczenia tych owadów w transmisji wirusów ludzi, których przykładem jest wirus gorączki krwotocznej krymsko-kongijskiej (CCHFV), wirus Oropouche (OROV), powodujący drugą po gorączce denga najczęstszą chorobę arbowirusową obszaru brazylijskiej Amazonii, czy wirus gorączki doliny Rift (RVFV), zagrażający ludziom, owcom i bydłu w Afryce. Oprócz arbowirusów wspomniane muchówki mogą odgrywać rolę wektora chorób pasożytniczych ludzi i zwierząt. Przykładem są pierwotniacze pasożyty krwi z rodzaju *Haemoproteus* i *Leucocytozoon* występujące u ptaków, czy tropikalne filariozy ludzi i zwierząt powodowane przez nicienie z



rodzaju *Onchocerca* czy *Mansonella*. Należy pamiętać, że jedynie samice *Culicoides* spp. żerują na żywicielach pobierając ich krew. Tą drogą może dochodzić do zakażenia zarówno żywiciela, jak i owada. W miejscu żerowania *Culicoides* spp. na skórze żywiciela mogą pojawić się objawy dermatologiczne w postaci świądu i zapalenia skóry, co notowane jest nierzadko u koni. Co ciekawe wykazano, że u muchówek z rodzaju *Culicoides* możliwa jest transowarialna transmisja arbowirusów, o czym świadczy ich obecność w owadach które nie pobierały dotychczas krwi żywiciela. W ostatnich latach obserwowane jest zjawisko rozszerzania zasięgu wielu patogenów i ich wektorów w kierunku północnym. Za to zjawisko odpowiadają zmiany środowiskowe spowodowane działalnością człowieka oraz zmiany klimatyczne. W konsekwencji dotychczas obce dla danej strefy klimatycznej zagrożenia biologiczne pojawiają się w nowych szerokościach geograficznych. Przykładem są uważane do niedawna za egzotyczne dla Europy centralnej i wschodniej arbowirusy przenoszone przez *Culicoides* spp., takie jak wirus choroby niebieskiego języka (BTV), czy wirus Schmallenberg (SBV). Wektory mogą przenosić bakterie, wirusy, pierwotniaki czy pasożytnicze nicienie między zwierzętami wolno żyjącymi a udomowionymi, czy w końcu między zwierzętami i ludźmi, stając się źródłem zakażenia/zarażenia patogenami o znaczeniu zoonotycznym. Wspomniane zagadnienie wpisuje się w koncepcję „Jedno Zdrowie” (One Health), która odnosi się do ochrony zdrowia człowieka przy współdziałaniu ochrony zdrowia zwierząt i uwzględnieniu wpływu środowiska naturalnego na zdrowie ludzi i zwierząt.

Zważywszy na powyższe, wybór tematu rozprawy uważam za bardzo dobrze przemyślany i trafny. Doktorantka zauważyła lukę badawczą w zakresie znaczenia *Culicoides* spp. w potencjalnym przenoszeniu czynników zakaźnych ludzi i zwierząt w naszej szerokości geograficznej i z sukcesem ją wykorzystywała podczas projektowania badań i realizacji pracy doktorskiej. Doktorantka wyodrębniła trzy cele badawcze rozprawy.

Pierwszy z postawionych celów badawczych dotyczy opracowania i optymalizacji metod wykrywania wirusów, bakterii, archeonów, grzybów i protista u *Culicoides* spp. z wykorzystaniem metagenomiki i metataksonomiki.

Drugi cel badawczy dotyczy identyfikacji znanych, endemicznych lub nowo pojawiających się wirusów, które mogą być przenoszone przez kuczmany.

Trzeci cel badawczy dotyczy określenia roli *Culicoides* spp. w przenoszeniu wirusa.

Wymienione cele badawcze uważam za słuszne obrane, ze względu na:

- aktualność przedstawionej tematyki w związku ze wzrostem znaczenia *Culicoides* spp. w przenoszeniu czynników etiologicznych groźnych chorób. Przykładem jest choroba niebieskiego języka (BT), której liczba ognisk w Europie zachodniej znacząco wzrosła w ubiegłym roku, a w listopadzie 2024 r. zarejestrowano pierwsze ognisko BT w Polsce;
- skąpe dane literaturowe na temat znaczenia muchówek z rodzaju *Culicoides* w przenoszeniu patogenów takich jak bakterie, wirusy, pierwotniaki i grzyby;



- skąpe dane literaturowe na temat składu mikrobiomu najpowszechniej występujących gatunków z rodzaju *Culicoides* w Polsce wraz z podziałem na różne formy gonotroficzne tych owadów;
- potrzebę opracowania niezawodnych, powtarzalnych metod identyfikacji chorobotwórczych patogenów ludzi i zwierząt w wektorach owadzich, co może przyczynić się do usprawnienia monitoringu epidemiologicznego na danym terenie, a tym samym szybkiego wykrycia nowych zagrożeń biologicznych.

Tytuł rozprawy doktorskiej w pełni odzwierciedla tematykę pracy, jest zwięzły i treściwy.

Ocena znajomości literatury dotyczącej problematyki badań

Należy uznać, że Doktorantka w pełni prawidłowo wykorzystwała bogate źródła piśmiennictwa, obejmujące 334 pozycje, datowane na lata 1713-2023. Lek. wet. Katarzyna Krasoń wykazała się znajomością najnowszej literatury z badanego zakresu tematycznego, o czym świadczy fakt, że aż 209 cytowanych w rozprawie publikacji (62%) ukazało się po 2010 r.

Poprawność i oryginalność metodyczna oraz zakres rozwiązania zagadnienia naukowego

Badania naukowe zostały zaprojektowane i przeprowadzone przez Doktorantkę w prawidłowy sposób, zgodnie z obowiązującymi standardami dla każdej z wybranych procedur. Doktorantka wykazała się wiedzą metodyczną na każdym etapie badań, jak również umiejętnością samodzielnego prowadzenia prac badawczych. Należy podkreślić, że lek. wet. Katarzyna Krasoń udowodniła, że sprawnie posługuje się nowoczesnymi metodami biologii molekularnej, które są oparte na sekwencjonowaniu nowej generacji (NGS). Umiejętność wykorzystania nowoczesnych narzędzi badawczych zgodnie z trendami nauki światowej, gwarantuje Autorce możliwość opublikowania wyników rozprawy w wysoko indeksowanych czasopismach naukowych, ułatwia także uzyskanie finansowania projektów badawczych w przyszłości.

Doktorantka dokonała optymalizacji metod opartych na NGS do wykrywania wirusów, bakterii, archeonów, grzybów i protista u muchówek z rodzaju *Culicoides*. Ma to znaczenie poznawcze i praktyczne, które przekłada się na rozwój nauk medycznych, weterynaryjnych i biologicznych. Zaproponowane narzędzia badawcze znajdują zastosowanie w ocenie epidemiologii patogenów transmitowanych przez krwiopijne wektory. Przykładem jest wykrycie w badanym materiale sekwencji DNA homologicznych do bakterii z rodzaju *Rickettsia*, *Yersinia*, *Chlamydia*, *Pseudomonas* i *Escherichia*, czy pasożytniczych pierwotniaków takich jak *Plasmosium* sp., *Leishmania* sp. i *Babesia* sp. oraz grzybów z rodzaju *Aspergillus* i drożdżaków *Candida* sp. Nie stwierdzono obecności materiału genetycznego potencjalnie patogennych wirusów zwierząt, wykryto jednak sekwencje homologiczne do RNA rodzaju *Rotavirus* czy *Hepacivirus*, do których należą wirusy powodujące takie choroby człowieka jak tzw. grypa żołądkowa, czy zapalenie wątroby typu C. Oprócz tego otrzymane przez Doktorantkę wyniki wskazują na możliwość wykorzystania zaproponowanych narzędzi badawczych do oceny składu mikroorganizmów endosymbiotycznych *Culicoides* spp., co może posłużyć do poznania ich znaczenia w biologii i fizjologii tych owadów. Szereg stwierdzonych



w ramach badań endosymbiontów odgrywa rolę w trawieniu składników pokarmowych na różnych etapach życia owada, a nawet wpływa hamująco na rozwój zakażeń innymi patogenami, przykładem jest hamowanie replikacji wirusów. Badania w kierunku składu mikrobiomu kuczmanów mogą przekładać się na strategie ekologicznej walki z tymi owadami poprzez zaburzenia funkcjonowania pewnych procesów fizjologicznych w organizmie owada wynikające z modyfikacji składu mikroorganizmów endosymbiotycznych.

Przeprowadzone przez Doktorantkę badania wykazały przydatność metodyki opartej na sekwencjonowaniu nowej generacji do badań mikrobiomu i wiromu muchówek z rodzaju *Culicoides*. W wyniku ich przeprowadzenia udowodniono różnice w składzie społeczności mikroorganizmów w zależności od gatunku owada, jego płci i formy gonotroficznej. Dodatkowo w wyniku przeprowadzonych analiz wykryto 12% dotychczas niesklasyfikowanych wirusów związanych z *Culicoides* spp., co poszerza wiedzę i otwiera drzwi do dalszych badań.

Niniejsza rozprawa doktorska wnosi wkład w badania eko-epidemiologiczne, które przyczyniają się do opracowania strategii zwalczania chorób przenoszonych przez wektory. Przedstawione wyniki są jak dotychczas najbardziej kompleksowym źródłem wiedzy na temat społeczności różnych grup mikroorganizmów muchówek z rodzaju *Culicoides*.

Przydatność uzyskanych wyników w praktyce

Przedstawiona przez Doktorantkę metodyka badawcza może zostać wykorzystana do nadzoru nad patogenami o znaczeniu medycznym i weterynaryjnym, w tym wirusów. Jest to problem szczególnie aktualny obecnie i w przyszłości. Należy się bowiem liczyć z tym, że postępujące ocieplenie klimatu wraz z poszerzającym się zasięgiem wektorów może spowodować pojawienie się kolejnych, nowych patogennych arbowirusów na terenie Polski. Metagenomika oparta na badaniu wektorów owadziach może zapewnić nowatorskie podejście do nadzoru w zakresie wykrywania i monitorowania patogenów przed wybuchem choroby i przyszłymi epidemiami. To podejście umożliwi stworzenie bazy danych przydatnej w dystrybucji wirusów, analizie wektorów i opracowaniu oceny ryzyka dla pojawiających się chorób zakaźnych.

Dodatkowo, uzyskane wyniki uprawniają do wyciągnięcia wniosku, że do badań monitorujących występowanie/rozprzestrzenianie patogenów przenoszonych przez krwio pijne owady na danym terenie można zarekomendować wykorzystanie opitych krwią żywiciela samic *Culicoides obsoletus/scoticus* complex.

Uwagi polemiczne i dyskusja

Rozprawa rzuca nowe światło na możliwość rozwiązania ciekawego poznawczo i ważnego praktycznie problemu naukowego, jakim jest wykorzystanie metody sekwencjonowania nowej generacji (NGS) w celu wykrycia patogenów ludzi i zwierząt w wektorze owadzi.

Chociaż bardzo wysoko oceniam wartość naukową przedstawionej do recenzji rozprawy, niemniej z obowiązku recenzenta i ciekawości naukowej, chciałabym prosić o Doktorantkę o ustosunkowanie się do kilku kwestii.

- Doktorantka kilkakrotnie użyła nieprawidłowo terminu „gospodarz” zamiast terminu „żywiciel” w odniesieniu do organizmów których krwią odżywiają się kuczmany. W tym kontekście samice *Culicoides* spp. należy traktować jako pasożyty zewnętrzne. Stąd stosowne byłoby użycie terminologii parazytologicznej. Według Słownika Parazytologicznego pod red. J. Złotorzyckiej z 1998 r., wydanego nakładem PTP: „Gospodarz (host) termin stosowany w odniesieniu do organizmów, w których lub na których osiedlają się organizmy symbiotyczne, a nie pasożyty. Nie należy go używać jako synonimu pojęcia żywiciel. To rozróżnienie nie występuje w terminologii angielskiej”.
- W tekście monografii kilkakrotnie pojawia się wyrażenie „rodzaj *Culicoides* spp.” Po podaniu kategorii systematycznej „rodzaj” a następnie jego nazwy nie stosuje się zapisu „sp./spp.”
- Kategorię systematyczną w randze rodziny i wyższą zapisujemy pismem prostym, a nie kursywą. Zapis należałoby ujednoczyć i poprawić w tekście całej monografii.
- Na str. 25 w obrębie ryciny 3 przedstawiającej cykl życiowy *Culicoides* spp. widnieje sformułowanie „pobranie posiłku z krwi”. Proponuję jego zmianę na „pobranie krwi żywiciela”.
- Gatunek *Culicoides achrayi*, jako gatunek leśny analizowanych muchówek stanowi ciekawy materiał do badań porównawczych, stąd moje pytanie o powody niewłączenia tego gatunku do analizy metataksonomicznej bakteryjnego genu 16S.
- Dlaczego w przypadku niektórych „partii” owadów nie zachowano podziału na konkretne formy gonotroficzne badanych gatunków muchówek?
- W części Dyskusja (rozdz. 5) znajdują się pewne ważne wnioski, które nie zostały przedstawione w rozdziale 6. Przykłady: „...analiza metagenomiczna jest o wiele bardziej wydajnym podejściem niż metataksonomia genu 16S”, „...obecność patogenów w formie *nulliparous* i samcach, może świadczyć, że niektóre patogeny mogą przenosić się transowarialnie”.
- W rozdziale 6 punkty od „a” do „f” uważam za wyniki, natomiast punkty „g” oraz „i” stanowią prawidłowo sformułowane wnioski. Punkt „h” należałoby zmodyfikować, rozpoczynając go od słów: „Największa różnorodność mikroorganizmów występuje...”
- Według mnie brakuje wniosku, że badania monitorujące udział w środowisku różnych czynników chorobotwórczych przenoszonych przez krwio pijne wektory można ograniczyć do badań mikrobiomu samic *Culicoides obsoletus/scoticus* complex w formie „opitej krwi” żywiciela.
- Moim zdaniem brakuje również wniosku, że gatunki synantropijne muchówek posiadają bogatszy skład mikrobiomu, w którym przeważa komponent bakteryjny, w odróżnieniu od skromnego składu mikrobiomu gatunku sylwatyicznego, w którym dominuje komponent grzybiczy.



- Jestem ciekawa jak wyniki otrzymane przez Doktorantkę korespondują z wynikami poprzednich badań dotyczących monitoringu zakażenia wirusem Schmallerberg w Polsce? Czy poprzednio wykonane badania pozwoliły na wykrycie wirusa Schmallerberg w tym samym materiale? Pytam w kontekście wyciągnięcia wniosku odnośnie skuteczności różnych metod molekularnych w wykrywaniu tego wirusa w muchówkach.
- Brak numeracji pozycji piśmiennictwa (rozdz. 7) utrudnia analizę tej części rozprawy.

Wniosek końcowy

Podsumowując stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187.1. Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2024 poz. 1571). Stanowi ona wyjątkowo cenne, oryginalne osiągnięcie naukowe lek. wet. Katarzyny Krasoń, wskazując na ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki, a także Jej umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy badawczej.

W związku z powyższym przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenia Pani lek. wet. Katarzyny Krasoń do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

Jednocześnie zgłaszam **wniosek o wyróżnienie** powyższej rozprawy doktorskiej ze względu na jej **nowatorski i aplikacyjny charakter**.

Dr hab. Anna Pyziel, prof. SGGW