



Wrocław, 2.09.2019 r.

Dr hab. Jolanta Piekarska, prof. nadzw.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Kingi Leśniańskiej pt. "Szop pracz (*Procyon lotor*, L) - introdukowany i inwazyjny gatunek jako potencjalny rezerwuuar zoonotycznych mikropasożytów jelitowych", wykonanej w Zakładzie Parazytologii Instytutu Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem promotora dr hab. Marcina Popiołka, prof. nadzw. oraz promotora pomocniczego dr Agnieszki Perec-Matysiak.

Szop pracz (*Procyon lotor*) to ssak z rodziny szopowatych (Procyonidae) występujący pierwotnie w Ameryce Północnej i Środkowej, który ze względu na dobrej jakości futro, został sprowadzony do Europy w celach hodowlanych na przełomie lat 20. i 30. XX wieku. Jako gatunek inwazyjny od kilkudziesięciu lat zajmuje w szybkim tempie coraz to nowe obszary Europy Zachodniej i Centralnej, w tym także Polski, a jego obecność niesie ryzyko długofalowych, negatywnych skutków dla populacji rodzimych gatunków zwierząt. Szop pracz jako drapieżnik wszechstronny, stanowi bardzo poważne zagrożenie dla różnorodności biologicznej, powodując zmianę lokalnych zależności troficznych oraz konkurencję o podobne nisze ekologiczne. Gatunek ten jest też żywicielem obcych pasożytów, m. in. bardzo groźnych nicieni – *Baylisascaris procyonis* i *Strongyloides procyonis*, oprócz tego przejął większość pasożytów rodzimych przez co pogarsza stan sanitarny środowiska przyrodniczego. Obecność szopów w pobliżu siedzib ludzkich może stwarzać zagrożenie dla zdrowia i życia człowieka stąd identyfikacja oportunistycznych mikropasożytów jelitowych z grupy kryptosporydiów i mikrosporydiów występujących u szopów jest istotnym zagadnieniem w kwestii zdrowia publicznego. Ze względu na coraz powszechniejszą obecność szopa ważne jest też oszacowanie ryzyka transmisji pasożytów występujących u szopa i współżyjących innych gatunków drapieżników. Podjęte przez Doktorantkę badania mają unikalny charakter, wpisują się w nurt współczesnych parazytologicznych badań środowiskowych i są pierwszymi prowadzonymi na taką skalę badaniami w populacjach gatunków inwazyjnych. Dane na temat parazytofauny zwierząt dziko żyjących nie tylko uzupełniają wiedzę o krążeniu pasożytów w środowisku, ale również



wskazują na ważną rolę gatunków inwazyjnych jako rezerwuaru potencjalnie zoonotycznych mikropasożytów jelitowych. W tym kontekście podjęte przez mgr Kingę Leśniańską badania są jak najbardziej uzasadnione, aktualne i potrzebne. Szkoda, że tytuł pracy odnosi się tylko do szopa pracza, podczas gdy wykonano badania i analizowano wyniki również dla innych gatunków zwierząt dziko żyjących.

Przedstawiona do oceny praca doktorska liczy 126 stron maszynopisu w tym 12 tabel i 17 rycin. Praca przygotowana jest w sposób typowy dla tego rodzaju opracowań i składa się z następujących rozdziałów: wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie i wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, spis rycin i tabel oraz bibliografia. Tekst pracy poprzedzony jest wykazem publikacji naukowych Doktorantki obejmujących wyniki zawarte w niniejszej rozprawie doktorskiej oraz wykazem referatów/plakatów z 6 krajowych i 4 międzynarodowych konferencji naukowych prezentujących wyniki badań oraz metodologię stosowaną w ramach recenzowanej rozprawy doktorskiej. Bibliografia zawiera 218 pozycji przedstawionych w porządku alfabetycznym, w większości pochodzących z ostatnich 10 lat, ale również prace znacznie starsze jak np. powszechnie uznane prace Tyzlera z lat 1907 – 1912. W bibliografii uwzględniono również profesjonalne strony internetowe.

W obszernym wstępie autorka w oparciu o bogatą literaturę fachową przedstawiła charakterystykę kryptosporydiów i mikrosporydiów uwzględniając ich biologię, zróżnicowanie genetyczne, cykle rozwojowe i chorobotwórczość oraz diagnostykę chorób przez nie wywoływanych. Autorka zwróciła uwagę, że mikropasożyty te choć niejednorodne pod względem systematycznym, morfologicznym i genetycznym charakteryzuje wspólna zdolność do wywoływania inwazji oportunistycznych u osób w różnym wieku i zróżnicowanym statusie immunologicznym, w tym także immunokompetentnych. Przytaczając wyniki globalnego raportu WHO/FAO z 2018 roku Autorka podkreśla, że omawiane mikropasożyty jelitowe ze względu na ich potencjał zoonotyczny nabierają dużego znaczenia i mogą stanowić poważny problem kliniczny i epidemiologiczny.

W drugiej części wstępu Doktorantka dokonała charakterystyki szopa pracza (*Procyon lotor*) oraz współtowarzyszących gatunków drapieżników tj. jenot azjatycki (*Nyctereutes procyonoides*), lis rudy (*Vulpes vulpes*), borsuk europejski (*Meles meles*), kuna leśna i domowa (*Martes martes*, *Martes fiona*) oraz opisała pasożyty i patogeny dotychczas u nich wykryte, w tym szczegółowo wyniki światowych badań dotyczące występowania u nich gatunków oraz genotypów kryptosporydiów i mikrosporydiów. Autorka zaprezentowała aktualny stan wiedzy na temat pochodzenia, klasyfikacji systematycznej i rozmieszczenia szopa pracza na obszarach introdukowanych, biologii gatunku i jego inwazyjności.



Ponadto przedstawiła historię ekspansji na terytorium Europy podając statystyki dotyczące liczebności populacji szopa. Zakres opisu (wzbogacony o przejrzystą grafikę) jest wystarczający, a treść rozdziału dobrze wprowadza czytelnika w zagadnienia stanowiące przedmiot badań i pozwala zrozumieć potrzebę i sens ich przeprowadzenia.

W następnej części pracy Autorka przedstawiła 4 cele badawcze, które zostały podjęte dla sprawdzenia założonej hipotezy badawczej, że szop pracz, jako gatunek inwazyjny, pełni rolę rezerwuaru potencjalnie zoonotycznych mikropasożytów jelitowych z rodzaju *Cryptosporidium* oraz mikrosporydiów (*Enterocytozoon bieneusi* i *Encephalitozoon* spp.). Cele zostały zdefiniowane w sposób jasny i zrozumiały, a postawienie ich znalazło uzasadnienie w rozważaniach zawartych we wstępie pracy doktorskiej.

Analizę występowania inwazji wybranych mikropasożytów jelitowych Doktorantka wykonała w oparciu o badanie 389 próbek kału pozyskanych w latach 2016 – 2019 od 6 gatunków dziko żyjących drapieżników z siedmiu miejsc badawczych zlokalizowanych na terenie Polski, Niemiec i Czech. Kał do badań był pobierany od zwierząt pozyskanych z odstrzałów regulacyjnych i zabitych w wypadkach komunikacyjnych, a następnie wykorzystany do izolacji DNA oraz amplifikacji przy użyciu konwencjonalnej reakcji PCR i nested-PCR. Doktorantka z dużą swobodą posługuje się prawidłowo dobranymi technikami molekularnymi w celu osiągnięcia założonych celów rozprawy doktorskiej. Opisy poszczególnych etapów badań, w tym izolacji materiału genetycznego, zastosowanych markerów molekularnych i warunków reakcji oraz stosowanej w badaniach aparatury są bardzo przejrzyste i świadczą o umiejętności dobrania odpowiednich narzędzi niezbędnych do zrealizowania planów badawczych.

Rozdział poświęcony wynikom pracy, Autorka rozpoczęła od zaprezentowania skali prevalencji mikropasożytów. Spośród badanych gatunków drapieżników najwyższą ogólną prevalencję zanotowano u szopa (54,4%) i jenota (54%), a najniższą u lisa (36%). Ogólna prevalencja mikropasożytów u badanych zwierząt była najwyższa dla *Cryptosporidium* spp. i wynosiła 30,2% natomiast dla *Enterocytozoon bieneusi* i *Encephalitozoon* spp. wynosiła odpowiednio 24,8% i 7,8%. W kolejnej części autorka analizowała prevalencję mikropasożytów szopa na poszczególnych terenach badawczych w Polsce, Niemczech i Czechach, a następnie przeprowadziła analizę dotyczącą występowania koinwazji u badanych drapieżników. Analizy sekwencji oraz analizy filogenetyczne umożliwiły uzyskanie informacji dotyczących charakteru wykrywanych patogenów oraz ich potencjału zoonotycznego. Wykazano, że najliczniej reprezentowanym genotypem *Cryptosporidium* u szopów z terytorium Polski i Niemiec był po raz pierwszy stwierdzony w Europie zoonotyczny genotyp skunksa. Potwierdzenie jego obecności u borsuka europej-



skiego wskazuje na możliwość transmisji obcego „zawleczonego” genotypu na rodzimą faunę. Wyniki badań w kierunku mikrosporydiów wykazały po raz pierwszy obecność u szopów europejskich potencjalnie zoonotycznych genotypów *E. bieneusi*: NCF2 oraz D. Równie interesujące były wyniki badań mikropasożytów u współwystępujących gatunków drapieźników. U jenota i u lisa najczęściej identyfikowano *Cryptosporidium canis* (odpowiednio psi i lisi genotyp) ale też potwierdzono występowanie gatunków i genotypów specyficznych dla innych zwierząt. Spośród mikrosporydiów u jenotów powszechny był *E. bieneusi* NCF2, po raz pierwszy potwierdzony u tych drapieźników w Europie, a u lisów *E. bieneusi* zoonotyczny genotyp D i C. Badania pozwoliły również na uzupełnienie wiedzy na temat występowania gatunków mikropasożytów jelitowych u borsuka oraz kun leśnych i domowych. Warto zaznaczyć, że w przypadku tych ostatnich były to pierwsze stwierdzenia przeprowadzone w tej części Europy. Opisowa część wyników badań została uzupełniona o liczne tabele i ryciny, które wzbogacają dysertację i ułatwiają porównania uzyskanych przez Doktorantkę wyników.

W rozdziale „Dyskusja” Autorka omówiła oraz wyczerpująco skonfrontowała uzyskane wyniki badań z aktualnym piśmiennictwem. Wykazała się dobrą znajomością problematyki oraz umiejętnością prezentowania obszernego materiału w formie zwartej i logicznej, jak również własnych poglądów odnośnie badanych zjawisk. Całość dyskusji dodatkowo wzbogaca wartość pracy i świadczy o dojrzałości naukowej i dobrym przygotowaniu merytorycznym.

Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka sformułowała dziewięć wniosków odnoszących się do osiągniętych celów badań i obrazujących najważniejsze osiągnięcia recenzowanej pracy.

Podsumowując, cel pracy został zrealizowany przez Doktorantkę, a recenzowana dysertacja doktorska stanowi oryginalne i bardzo wartościowe opracowanie dotyczące różnorodności genetycznej kryptosporydiów i mikrosporydiów w populacji dziko żyjących drapieźników, zwłaszcza w kontekście ich rosnącego znaczenia jako czynników etiologicznych inwazji oportunistycznych u człowieka.

Z obowiązku recenzenta chciałabym zwrócić uwagę na niektóre błędy i niedociągnięcia, które powinny być skorygowane podczas przygotowywania pracy do druku:

- str. 16, 22 - zamiast „wakuola parazytoforusa” poprawniej użyć określenia „parazytoforus” lub „wakuola pasożytnicza” , gdyż są to określenia równoważne (Leksykon Parazytologiczny, Warszawa, 2016),
- str.18 – opis: „ testy.... typu ELISA np. wykrywające koproantygen ELISA” zmienić na „ testy.... typu ELISA np. wykrywające koproantygen”



ZAKŁAD PARAZYTOLOGII

KATEDRY CHOROÓB WEWNĘTRZNYCH Z KLINIKĄ KONI, PSÓW I KOTÓW

- str. 39 – należy wprowadzić pełną nazwę gatunkową – *Angiostrongylus vasorum*, gdyż zastosowany skrót „*A. vasorum*”, po wcześniej występującej nazwie „*Aelurostrongylus pridhami*”, sugeruje inny gatunek nicieni

W rozdziale „Wyniki” i „Dyskusja” należy wprowadzić prawidłowe odniesienia do tabel i rycin tj.:

- str. 63 - ogólną prevalencję mikropasożytów u badanych drapieżników prezentuje Ryc.9 zamiast podanej w pracy Ryc.10,

- str. 64 – opis wyników ilustrują kolejno Tab. 8 i Tab.11 zamiast Tab 11. i Tab.8

- str. 66 – Ryc.10 obrazująca prevalencję mikropasożytów u szopa pracza z uwzględnieniem krajów ujętych w badaniach wymaga uzupełnienia o nazwy gatunkowe badanych pasożytów

- str. 73 – poprawić błąd w opisie: „ najvyšszy odsetek koinwazji zanotowano u kun – 12,1% (4/33)” – powinno być u jenotów - zgodne z Ryc.14, do której odwołuje się Autorka

- str. 90 i 91 prevalencję *E. bieneusi* u jenota i lisa prezentują Tab.10 i Ryc. 12 zamiast podanej Ryc.11 i Ryc. 17

- str. 92 – opis: „ najrzadziej identyfikowanym spośród badanych mikropasożytów był *Encephalitozoon* spp. z prevalencją wynoszącą od 4% do 13,%, (ryc. 11)” jest niezgodny z danymi przedstawionymi na Ryc. 11

Uzupełnić bibliografię o następujące pozycje, które zostały przywoływane w pracy:

- str. 14, 84 - Xiao i wsp. 2004;

- str. 17 – O Donogue 1995

- str. 21 – Weis 2001,

- str. 26 – Frantz i wsp. 2005

- str. 30 – Bartoszewicz i wsp. 2012

- str. 32 – Dudek i wsp. 2017

- str. 33 – Jędrzejewska i Jędrzejewski 2001

- str. 38, 85 - Alvarado-Rybak i wsp. 2016; Harris 2016; Laurimaa i wsp.2016, Thies i wsp.2001; Brużinskaite-Schmidhalter i wsp.2012; Al -Sabi i wsp. 2013; Tackmann i wsp. 2003; Borecka i wsp. 2009; Karamon i wsp.2014

- str. 44- Kamieniarz i Jerzak 1998

- str. 93 -Arno i wsp. 2019; - Kauhala i wsp. 1998; - Kauhala i Ihalainen 2014



UNIwersytet
Przyrodniczy
we Wrocławiu

ZAKŁAD PARAZYTOLOGII
KATEDRY CHOROÓB WEWNĘTRZNYCH Z KLINIKĄ KONI, PSÓW I KOTÓW

Usunąć z bibliografii następujące pozycje, które nie są cytowane w pracy (nr: 1; 5, 61, 72, 78, 87, 139, 153, 154, 184).

Podsumowując, pragnę podkreślić, że wymienione powyżej uwagi mają charakter porządkowy i nie zmniejszają wartości poznawczych recenzowanej rozprawy. Doktorantka w pełni zrealizowała postawione w założeniach pracy cele i wyciągnęła trafne wnioski. Rozprawa wnosi nowe, oryginalne wartości poznawcze i poszerza wiedzę na temat parazytofauny zwierząt dziko żyjących oraz zagrożeń dotyczących transmisji zoonotycznych pasożytów istotnych z punktu widzenia zdrowia publicznego. Biorąc pod uwagę jej całość uważam, że praca doktorska mgr Kingi Leśniańskiej spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2017 poz. 1789 ze zm.), dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu we Wrocławiu wniosek o dopuszczanie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


dr hab. Jolanta Piekarska, prof.nadzw.

