

dr hab. Piotr Solarczyk

Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

ul. Fredry 10, 61-701 Poznań

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ pt.

"Szop pracz (*Procyon lotor*, L) – introdukowany i inwazyjny gatunek jako potencjalny rezerwuar zoonotycznych mikropasożytów jelitowych"

pani mgr Kingi Leśniańskiej

z Zakładu Parazytologii

Instytutu Genetyki i Mikrobiologii

Uniwersytetu Wrocławskiego

Domowe, hodowlane i dzikie zwierzęta mogą być źródłem chorób zakaźnych dla ludzi. Jednak problem zoonotycznego potencjału wielu czynników etiologicznych wywodzących się od zwierząt dziko żyjących nadal budzi najwięcej kontrowersji nie tylko w Polsce ale i na całym świecie. Obecnie, nie istnieje uniwersalny i prosty sposób oceny jednokomórkowych pasożytów jelitowych, który jednoznacznie w sposób szybki umożliwiłby precyzyjną ocenę złożoności problemu zoonotyczności wykrytych patogenów. Według Jonesa i wsp., (2008), w ostatniej dekadzie sklasyfikowano 35 gatunków jednokomórkowych organizmów pasożytniczych, które stanowią większy lub mniejszy problem dla zdrowia publicznego i związanych z nimi zarażeń odzwierzęcych. Na tej liście znajdują się organizmy będące obiektami badań zawartymi w rozprawie doktorskiej Pani mgr Kingi Leśniańskiej należących do jednokomórkowych pasożytów (*Cryptosporidium* sp.) i grzybów (mikrosporydia *Enterocytozoon bieneusi* oraz *Encephalitozoon* spp.). Ponadto, na jeszcze większą złożoność problemu oszacowania potencjału zoonotycznego wpływa fakt dużej liczby gatunków dzikich zwierząt będących żywicielami wspomnianych mikropasożytów i ich wzajemnych środowiskowych interakcji. Także, istotnym wyzwaniem w trakcie pracy z przedstawicielami „dzikiej fauny” do których zaliczyć można drapieżne ssaki (szop pracz, jenot azjatycki, lis rudy, borsuk europejski czy kuna) jest pozyskanie prób kału ze środowiska. Jeśli nie ma możliwości pobrania prób bezpośrednio od zwierząt w trakcie sekcji w postaci zawartości jelita to uzyskuje się materiał z gruntu w miejscu obecności ssaka. Z reguły nie jest on łatwo dostępny, a często uzyskany materiał jest w małych ilościach jak i niskiej (zanieczyszczonej) jakości.

Chociaż w ostatnich latach wyjaśniono wiele aspektów epidemiologii zarówno kryptosporydiozy jak i mikrosporydiozy, to nadal nie wiadomo jaką rolę odgrywają dzikie zwierzęta w ich transmisji. Należy przy tym podkreślić, że identyfikacja możliwych źródeł zarażenia i zasięgu żywicieli jest piwotalnym problemem w epidemiologii i zapobieganiu zarówno kryptosporydiozy oraz mikrosporydiozy. W rozwiązaniu tego zagadnienia pomocne są techniki biologii molekularnej. Molekularna charakterystyka danych uzyskanych z wielomarkerowej analizy pozwala bowiem nie tylko na rozróżnienie blisko spokrewnionych gatunków, ale umożliwia także zilustrowanie transmisji poprzez precyzyjne oznaczenie genotypu pasożyta, a tym samym źródła zarażenia.

Wobec powyższego, zaproponowany i zrealizowany temat pracy przez Panią mgr Kingę Leśniańską, zmierzający do określenia roli szopa pracza jako introdukowanego i inwazyjnego gatunku będącego potencjalnym rezerwuarem zoonotycznych mikropasożytów jelitowych jest wysoce uzasadniony. Należy także zaakcentować, że niektóre fragmenty przedstawionych badań są pionierskie.

Rozprawa doktorska Pani mgr Kingi Leśniańskiej jest napisana bardzo przejrzysto; liczy 126 stron oraz zawiera 12 tabel i 17 rycin. Całość poprzedza wykaz publikacji naukowych obejmujących wyniki zawarte w rozprawie doktorskiej (jedna opublikowana w czasopiśmie o wysokim współczynniku IF, druga w przygotowaniu do publikacji w zagranicznym czasopiśmie). Pozostały wykaz obejmuje: jedną publikację oryginalną w polskim czasopiśmie oraz spis 7 doniesień ze zjazdów i konferencji o zasięgu krajowym, jak i 6 z konferencji o zasięgu międzynarodowym na których przedstawiono z wyniki oraz metodologię w ramach rozprawy doktorskiej. Pozostały wykaz 3 „impaktowanych” publikacji obejmował zagadnienia nie związane z rozprawą doktorską, w których Pani mgr Kinga Leśniańska była współautorką.

Przedstawiona do oceny dysertacja zawiera wszystkie rozdziały typowe dla rozprawy doktorskiej, które wieńczy obszernie streszczenie w języku polskim i angielskim. Każdy z rozdziałów zawiera liczne podrozdziały ułatwiające czytelnikowi zapoznanie się z treścią pracy i śledzenie kierunku opracowania wykonanych badań. W swojej pracy Doktorantka umieściła aż 207 pozycji odpowiednio, dobranego w większości anglojęzycznego, niemieckiego (9 pozycji) i polskiego (20 pozycji) piśmiennictwa oraz cytowań 5 aktów prawnych, co świadczy o bardzo dobrej znajomości literatury fachowej. Ponadto, podane zostało 6 cytowanych źródeł internetowych. Podkreślenia wymaga także schludność i dobrze opracowana szata graficzna rozprawy.

Wstęp pracy jest przeglądem najważniejszych aspektów wiedzy nt. *Cryptosporidium* i mikrosporydiów, a także charakterystyka zwierząt należących do drapieżników ujętych w badaniach. W oparciu o dane literaturowe Autorka omawia systematykę, cykle rozwojowe i krążenie patogenów w środowisku, kładąc szczególny nacisk na właściwości pasożyta wpływające na środowiskową dyspersję oraz ich zoonotyczny charakter. We wstępie omawia także diagnostykę, jak i najnowsze trendy oraz osiągnięcia badań, co świadczy o dużej wiedzy i profesjonalizmie Autorki.

Cel rozprawy doktorskiej przedstawiono klarownie. Pomimo wybrania jednego gatunku żywiciela – szopa pracza jako wiodącego obiektu badań, to na uwagę zasługuje holistyczne podejście Autorki, bowiem włączyła do badań współtowarzyszące gatunki drapieżników takie jak jenot azjatycki, lis rudy, borsuk europejski czy dwa gatunki kun - leśnej i domowej. Aby wykazać jaką rolę odgrywa introdukowany i inwazyjny gatunek szopa pracza jako rezerwuuar zoonotycznych mikropasożytów jelitowych Autorka:

- (1) poprzez analizę molekularną określała ekstensywność inwazji mikropasożytami jelitowymi u szopa pracza z różnych terenów;
- (2) zbadała prewalencję *Cryptosporidium* sp i mikrosporydiów u współwystępujących z szopem praczem zwierząt drapieżnych wykorzystując do ich analizy metody statystyczne i molekularne;
- (3) określiła interakcję i potencjał zoonotyczny wykrytych mikropatogenów, a także;
- (4) oszacowała ryzyko dwukierunkowej transmisji *Cryptosporidium* sp., *E. bienersi* i *Encephalitozoon* sp. u współbytujących z szopem drapieżników.

Metody badań doktorantka przedstawiła w sposób bardzo szczegółowy i jasny. Przystępując do realizacji założeń swojej pracy Autorka musiała się wykazać znajomością i opanowaniem różnych

metod i technik biologii molekularnej popartych zastosowaniem metod statystycznych do analizy uzyskanych danych. Wykorzystanie tak dużej różnorodności instrumentarium badawczego świadczy o gruntownym podejściu, które jest pomocne w intelektualnej konsekwencji dociekań epidemiologicznych.

Obecnie jesteśmy świadkami dynamicznych zmian epidemiologicznych *Cryptosporidium* i mikrosporydiów, związanych z poszerzeniem ich kręgu żywicielskich, które mają wpływ na zdrowie publiczne. W ten trend wpisują się wyniki badań Pani mgr Kingi Leśniańskiej, które przedstawiła w poszczególnych podrozdziałach, bardzo szczegółowo i rzetelnie ilustrując uzyskane dane. Przedstawione wyniki jednoznacznie wskazują, że ambitne założenia pracy zostały zrealizowane; zarówno u szopa pracza, jak i towarzyszących gatunków ssaków drapieżnych z różnych stanowisk (7 miejsc badawczych w 3 krajach) wykryto DNA *Cryptosporidium* oraz *E. bieneusi* i *Encephalitozoon* sp.. Analiza molekularna (oparta na fragmencie sekwencji DNA aktywny) 20 izolatów *Cryptosporidium* uzyskanych od szopa pracza pozwoliła scharakteryzować je jako *Cryptosporidium* „genotyp skunksi”. Obecność tego genotypu także potwierdzono w jednej próbie od borsuka. Ponadto, pozostałe izolaty *Cryptosporidium* wykryte należały do *C. canis* „genotyp psi” (od jenota), *C. erinacei* (od jenota i borsuka) i *C. suis* (od jenota), *C. canis* „genotyp lisi” (od lisa), *Cryptosporidium* dwóch „genotypów nornika” MK-2018a i II (od lisa) i *C. ditrichi* (od kuny leśnej). Podobnie, Autorka na podstawie sekwencji ITS rDNA scharakteryzowała dwa genotypy *E. bieneusi* uzyskanych od szopa pracza oznaczonych jako NCF2 i D. Obecność DNA powyższych genotypów *E. bieneusi* potwierdziła także u jenota, lisa i kuny leśnej. W zestawieniu genotypów *E. bieneusi* wykrytych w niniejszych badaniach należy wymienić jeszcze „genotyp C” (od lisa), „genotyp EbCar2” (od borsuka) i „genotyp IV” (od kuny leśnej/domowej). Trzecim, wewnątrzkomórkowym patogenem wykrytym u szopa, jenota, borsuka i kuny leśnej/domowej był scharakteryzowany do rodzaju *Encephalitozoon* sp.

Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że po raz pierwszy na świecie przeprowadzono badania dotyczące występowania *Cryptosporidium*, *E. bieneusi* oraz *Encephalitozoon* sp. u wolnożyjących szopów, które są gatunkiem inwazyjnym. Wraz z ekspansją na nowe terytoria, ten gatunek żywiciela nabywa, szerzy i utrzymuje w przyrodzie zoonotyczne izolaty jednokomórkowych patogenów jelitowych, co wiąże się to z dużymi konsekwencjami epidemiologicznymi dla rodzimej fauny i ludzi, co Autorka potwierdziła w trakcie niniejszych badań (obecność u szopów praczy *Cryptosporidium* „genotypu skunksa”, *E. bieneusi* genotypów D i NCF2 i *Encephalitozoon* sp. – dwa ostatnie są pierwszym stwierdzeniem). Jednocześnie Autorka wykazała, obecność zarówno specyficznych jak i potencjalnie zoonotycznych patogenów z rodzaju *Cryptosporidium* i mikrosporydiów u dzikich ssaków drapieżnych. Część ujętych wyników jest pierwszym stwierdzeniem, co zasługuje na podkreślenie znaczenia dla poszerzenia wiedzy i jej wpływu na naukę.

Dyskusja rozprawy doktorskiej jest umiejętnie przeprowadzona i oparta jest o właściwie dobraną literaturę. Autorka, krytycznie analizuje i porównuje wyniki własnych badań z wynikami uzyskanymi przez innych autorów. Świadczy to o dobrym przygotowaniu merytorycznym i wiedzy niezbędnej do obiektywnych rozważań nie tylko o znaczeniu introdukowanego gatunku jakim jest szop pracz ale także o konsekwencji obecności mikropasożytów u współwystępujących dzikich ssaków drapieżnych.

Pani mgr Kinga Leśniańska zamyka rozprawę 9 wnioskami, które odpowiadają celom pracy stanowiąc logiczne zakończenie uzyskanych wyników.

Jak w większości publikacji naukowych, tak i w niniejszej rozprawie doktorskiej można znaleźć drobne błędy, które jednak nie wpływają na ocenę merytoryczną pracy. Jednakże w moim obowiązku jest zwrócenie uwagi na owe niedociągnięcia: (1) pomimo opisania w rozdziale „Materiały i metody” markera (fragmentu genu kodującego białko ściany oocyst) COWP do

molekularnej charakterystyki *Cryptosporidium* to nie ma odniesienia w wynikach i dyskusji o celowości jego użycia. W moim odczuciu, dane uzyskane z pozostałych 2 markerów tj. 18S rRNA oraz fragmentu genu kodującego aktynę w celu opisania implikacji epidemiologicznych są wystarczające; (2) na Ryc. 10 (str.66) brakuje wstawienia opisu badanych gatunków mikropasożytów; (3) drobne błędy edytorski w rozdziale „Bibliografia” (pozycja 98, 108, 125, 184)

Podsumowując całość, stwierdzam, że przedstawiona rozprawa jest wszechstronną i głęboką analizą umożliwiającą rozwiązanie trudnego zagadnienia. Jest oryginalna, nowatorska i wiele wnosi od strony badawczej. Wskazuje na znaczną rolę nie tylko inwazyjnego gatunku jakim jest szop pracz ale i innych ssaków drapieżnych dziko żyjących w utrzymywaniu w środowisku różnych genotypów *Cryptosporidium E. bieneusi* i *Encephalitozoon* sp., które stanowią zagrożenie dla zdrowia. Istotna rola ssaków drapieżnych w transmisji tych groźnych patogenów została potwierdzona wynikami molekularnej charakterystyki. Stwierdzam, że rozprawa wymagała dużego nakładu pracy i czasu, a jednocześnie wymagała znajomości i opanowania molekularnych, bioinformatycznych i stystycznych technik badawczych. Jest nowoczesna i świadczy o profesjonalnym warsztacie naukowym, w którym została wykonana. Tak kompleksowe przeprowadzenie badań jest możliwe w ośrodku, w którym doktorantka ma merytoryczne wsparcie swojego promotora.

Należy wspomnieć, iż oprócz głównego nurtu prowadzonych badań, istotnymi osiągnięciami w przedstawionej pracy doktorskiej było także: (1) wykrycie po raz pierwszy w Europejskiej populacji jenota i lisa *E. bieneusi* „genotyp NCF2”, (2) wykrycie DNA *E. bieneusi* „genotypu C” w próbie od lisa, które było dotychczas scharakteryzowane jedynie u ludzi, (3) pierwsze stwierdzenie *Encephalitozoon* sp. u jenota, jak również (4) pierwsze potwierdzenie wykrycia DNA kilku patogenów należących do *C. ditrichi*, dwóch genotypów *E. bieneusi* „NCF2 i IV” i *Encephalitozoon* sp. u kun.

Mając to na uwadze, Wnoszę do Wysokiej Rady Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani mgr Kingi Leśniańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, ze względu na rzetelne i wszechstronne opracowanie podjętego tematu, obszerny materiał, różnorodność metod badawczych, wysoki poziom merytoryczny i wprowadzenie nowych wartości do poznania epidemiologii kryptosporydiozy i mikrosporydiozy występujących u zwierząt dziko żyjących, wnoszę o przedstawienie rozprawy pani mgr Kingi Leśniańskiej do Nagrody Jego Magnificencji Rektora Uniwersytetu Wrocławskiego.

Poznań, dnia 19 sierpnia 2019 roku

