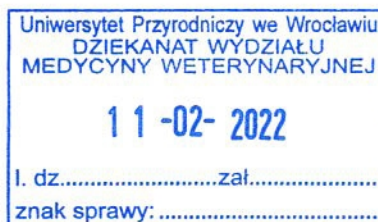


dr hab. n. med i n. o zdr. Maria Wesołowska  
Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej  
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
ul. Mikulicza-Radeckiego 9  
50-345 Wrocław

Wrocław, 10.02.2022



## RECENZJA

rozprawy doktorskiej lek. wet. Agnieszki Piekary-Stępińskiej

pt. „Występowanie pierwotniaków z rodzaju *Cryptosporidium* i *Giardia* u psów i kotów w Polsce”

Pierwotniaki z rodzajów *Giardia* i *Cryptosporidium* są szeroko rozpowszechnionymi w środowisku pasożytami układu pokarmowego i mogą być przyczyną poważnych gastroenterologicznych problemów klinicznych zarówno u ludzi jak i u zwierząt. Należą one do pasożytów oportunistycznych, które szczególnie zagrażają organizmom z zaburzeniami odporności. Do tej pory opisano ponad 40 gatunków *Cryptosporidium*, a wielu z nich przypisuje się wysoki potencjał zoonotyczny. W obrębie gatunku *Giardia intestinalis* wyodrębniono osiem, morfologicznie nierozróżnialnych genotypów i jest on także potencjalnym patogenem zoonotycznym, ponieważ niektóre jego genotypy występują zarówno u zwierząt jak i u ludzi. Zwierzęta towarzyszące, żyjące w bliskim kontakcie z człowiekiem, są również narażone na inwazje pierwotniaków z rodzajów *Cryptosporidium* i *Giardia*, stanowiąc często ich rezerwuar.

Prewalencja występowania *Cryptosporidium* spp. i *G. intestinalis* u zwierząt jest zróżnicowana i zależy od badanej populacji. W Polsce brakuje aktualnych danych dotyczących epidemiologii *Cryptosporidium* i *G. intestinalis* u psów i kotów, a te które są dostępne mają zwykle charakter ściśle regionalny i z reguły obejmują małą liczbę badanych zwierząt. Istotnym elementem kontroli oportunistycznych zarażeń pasożytniczych, z punktu widzenia zdrowia publicznego, jest poznanie źródeł i dróg transmisji form inwazyjnych. W związku z tymi argumentami, temat przedstawionej do mojej oceny rozprawy doktorskiej jest wysoce aktualny, a także wpisuje się w koncepcję „One Health”, która postrzega rozwiązywanie zagrożeń dla zdrowia ludzi, zwierząt i środowiska jako całości.

Głównym celem rozprawy była identyfikacja gatunkowa pierwotniaków z rodzaju *Cryptosporidium*, określenie genotypów *G. intestinalis* w próbkach kału pochodzących od psów i kotów z terenu Polski a także określenie prewalencji oraz oszacowanie ryzyka wystąpienia inwazji w populacji tych zwierząt w kraju. Ponadto Doktorantka podjęła się określenia roli czynników predysponujących

do wystąpienia kryptosporydiozy i giardiozy oraz określenie ryzyka zoonotycznego ze strony psów i kotów.

Podstawę rozprawy doktorskiej stanowią dwie prace opublikowane w recenzowanych czasopismach, które posiadają współczynnik oddziaływania (Impact Factor). Podkreślić należy, że w obydwu pracach Doktorantka jest pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym, a z oświadczeń podpisanych przez współautorów wynika, że Doktorantka miała decydujący udział w badaniach (70%), których wyniki zostały opublikowane w powyższych pracach. Łączny współczynnik oddziaływania tych publikacji wynosi 2,89, a punktacja MNiSW - 140 punktów.

Struktura ocenianej pracy uwzględnia takie rozdziały jak: streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cel pracy, omówienie badań, wnioski oraz podsumowanie. Praca zawiera również kopie opublikowanych artykułów naukowych, składających się na rozprawę doktorską i oświadczenia współautorów odnośnie wkładu w powstanie publikacji. Na pochwałę zasługuje staranne przygotowanie pracy pod względem językowym i edytorskim.

Wstęp stanowi wartościowy przegląd literatury, podzielony na 10 rozdziałów/podrozdziałów. Doktorantka ze znanstwem i w zwięzły sposób omówiła systematykę, biologię, źródła i drogi zarażenia, epidemiologię oraz współczesne techniki badawcze pierwotniaków z rodzaju *Cryptosporidium* i *Giardia*. Na uwagę zasługuje wnikliwa ocena sytuacji epidemiologicznej w zakresie występowania tych pierwotniaków u psów i kotów w Polsce i w Europie, w oparciu o odpowiednio dobrane, aktualne piśmiennictwo (112 pozycji). Porównanie danych literaturowych ujawniło duże zróżnicowanie zarówno w liczebności badanych populacji, poziomie zarażenia *Cryptosporidium* i *Giardia* jak i doboru narzędzi badawczych. Wykazało również skromny udział danych literaturowych pochodzących z Polski i wynikającą z tego potrzebę uzupełnienia tych danych. W świetle wiedzy przedstawionej we wstępie, uważam, że podjęcie powyższego tematu rozprawy było w pełni uzasadnione.

Badania składające się na niniejszą dysertację zostały podzielone na dwie części, z których pierwsza dotyczyła występowania *Cryptosporidium* spp., druga część *G. intestinalis* u psów i kotów w Polsce a wyniki, jak już wspomniano, zostały opublikowane w dwóch pracach.

W pierwszej pracy o charakterze oryginalnym, zatytułowanej „*Cryptosporidium* spp. in dogs and cats in Poland”, opublikowanej w czasopiśmie *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, Doktorantka zbadała występowanie *Cryptosporidium* u psów i kotów w Polsce. Godna uwagi jest wysoka liczba przebadanych zwierząt (365 psów i kotów) oraz szeroki zasięg terytorialny badań, obejmujący dziewięć województw. Badania materiału biologicznego - kału zwierząt, zostały przeprowadzone w oparciu o nowoczesny warsztat badawczy, w pełni porównywalny do stosowanego

w ośrodkach zagranicznych. Na podkreślenie zasługuje duża staranność w przeprowadzeniu zaplanowanych badań klasycznymi metodami badawczymi jak i z użyciem technik molekularnych (amplifikacja fragmentu genu kodującego małą podjednostkę rybosomu 18S rRNA *Cryptosporidium* techniką nested-PCR). Analiza statystyczna została zaplanowana i przeprowadzona poprawnie.

*Cryptosporidium* spp. stwierdzono w 3,4% próbek pochodzących od psów i 2% próbek pozyskanych od kotów. Sekwencjonowanie produktów pozwoliło na wykrycie trzech gatunków *Cryptosporidium*: *C. parvum* i *C. canis* u psów oraz *C. felis* u kotów. Badania wykazały, że choć wyniki wykazują duże zróżnicowanie regionalne, to odsetek zarażonych zwierząt w Polsce nie odbiega poziomem od tego zaobserwowanego w innych krajach Europy, co może świadczyć o porównywalnym statusie epidemiologicznym. W badaniach przeprowadzonych w ostatnich latach w Polsce (oprócz jednego wykonanego na małej grupie zwierząt) nie identyfikowano gatunków *Cryptosporidium* u psów i kotów, a zatem jest to pierwsza, szeroka analiza molekularna krajowej populacji zwierząt towarzyszących. Uzyskane przez doktorantkę wyniki badań, oprócz wartości poznawczych, mają również ważny aspekt epidemiologiczny, szczególnie w kontekście zdrowia publicznego w Polsce. Wykazały bowiem, że zwierzęta towarzyszące mogą być rezerwuarem zoonotycznych gatunków *Cryptosporidium*. Należy podkreślić, że przygotowanie tego badania wymagało dużego nakładu pracy.

W drugim artykule o charakterze oryginalnym, pt.: „Genotypes of *Giardia duodenalis* in household dogs and cats from Poland”, opublikowanym w czasopiśmie *Acta Parasitologica*, przedstawiono wyniki badań dotyczących epidemiologii *G. intestinalis*. W tym momencie chcę zaznaczyć, że nazwą obowiązującą jest *G. intestinalis*. Badania próbek kału pochodzących od 293 zwierząt domowych z różnych województw, zostały przeprowadzone z wykorzystaniem klasycznych metod badawczych (metody flotacji, hodowli), testów immunoenzymatycznych wykrywających koproantygeny *G. intestinalis*, oraz analizy molekularnej (amplifikacja metodą nested-PCR fragmentu genu kodującego  $\beta$ -giardinę). Dobór metod zastosowanych w niniejszym badaniu jest odpowiedni i nie budzi zastrzeżeń. Materiał genetyczny *G. intestinalis* został wykryty w 6% próbek pochodzących od psów oraz 3,9% próbek pochodzących od kotów. Cenną obserwacją było porównanie skuteczności metody nested-PCR i szybkich testów immunochromatograficznych, wykrywających antygen *G. intestinalis*. Odsetek prób, w których wykryto antygen *G. intestinalis* był znacznie wyższy w porównaniu do wyników uzyskanych w badaniu metodą nested-PCR. Jak zaznacza Autorka, badania porównawcze przeprowadzono tylko na części materiału, jednak wykazały one, że zastosowanie różnych metod badawczych zwiększa dokładność uzyskanych wyników. Ważnym osiągnięciem pracy było ustalenie, że na terenach objętych badaniem, dominującymi genotypami są u psów C i D a u kotów A i F. Należy nadmienić, że zoonotyczny genotyp A może wywoływać również inwazje u ludzi, co jest szczególnie

istotne w stanach niedoborów odporności i wskazuje, że zwierzęta towarzyszące mogą być potencjalnym rezerwuarem tych oportunistycznych pasożytów.

W prowadzonych obserwacjach Doktorantka zwróciła również uwagę na czynniki predysponujące do wystąpienia inwazji *G. intestinalis*. Wyższą częstość zarażenia odnotowano u psów poniżej 1 roku życia, co potwierdza, że młode zwierzęta są szczególnie narażone na inwazję tego pierwotniaka. Wśród przebadanych psów, należących do 48 ras, wyraźnie wyższy odsetek poziomu zarażenia *Giardia* stwierdzono u buldogów francuskich (25% przebadanych psów tej rasy), co jest pierwszą taką obserwacją opisaną w literaturze. A zatem wyniki przeprowadzonego badania mają istotny aspekt zarówno kliniczny jak i praktyczny w kontekście epidemiologii i profilaktyki giardiozy.

Z obowiązku recenzenta chciałabym się podzielić kilkoma uwagami, które nie pomniejszają wartości merytorycznej rozprawy a wymagają jedynie doprecyzowania informacji:

- we wstępie, w tabeli nr 4 i 5, dla pozycji piśmiennictwa nr 6 i 61 brakuje określenia badanego obszaru;
- w rozdziale „Omówienie badań” uściślenia wymaga stwierdzenie „Zakres wykonanych badań zależał od ilości pozyskanego materiału, czasu jaki upłynął od jego pobrania...” Nie znalazła się w tekście informacja, czy wobec powyższego wszystkie próby były zbadane takimi samymi metodami;
- za wadę rozdziału „Omówienie badań” uważam zbyteczne zamieszczenie informacji o metodyce i prowadzeniu hodowli pierwotniaka *Blastocystis*; z pewnością są to interesujące dane, ale nie są związane z tematem pracy;
- omówienie rezultatów badań jest nieco zawile. W mojej ocenie tabelaryczne ujęcie wyników ułatwiłoby Doktorantce klarowne przedstawienie uzyskanych rezultatów a czytelnikowi możliwość szybkiego zapoznania się z zestawionymi danymi;
- jak już wspomniałam, obecnie za ważną przyjmuje się nazwę gatunkową jest *G. intestinalis*, uznając za synonimy pozostałe nazwy (m. in. *G. duodenalis*).

### **Podsumowanie**

Przedłożoną mi do recenzji pracę doktorską oceniam pozytywnie. Lekarka weterynarii Agnieszka Piekara wykazała się szeroką wiedzą teoretyczną, bardzo dobrym opanowaniem warsztatu parazytologicznego oraz umiejętnością analizy i interpretacji wyników badań laboratoryjnych.

Cele badawcze rozprawy doktorskiej zostały przez Doktorantkę sformułowane prawidłowo i przejrzysto a wnioski ujęte trafnie i syntetycznie. Uzyskane wyniki są ważnym uzupełnieniem dotychczasowej wiedzy dotyczącej epidemiologii zarażeń zwierząt towarzyszących w Polsce i uzasadniają stwierdzenie, że pierwotniaki z rodzaju *Cryptosporidium* spp. i *G. intestinalis* mogą

stanowić realne zagrożenie nie tylko dla psów i kotów ale i ludzi, zwłaszcza w odniesieniu do osób z deficytami odporności.

Dzięki wykorzystaniu technik biologii molekularnej, badania umożliwiły określenie udziału poszczególnych gatunków/genotypów pierwotniaków jelitowych – *Cryptosporidium* spp. i *G. intestinalis* u psów i kotów w Polsce, co jest istotne nie tylko z punktu widzenia zdrowia zwierząt, ale również z uwagi na wysoce zoonotyczny charakter niektórych spośród tych wykrytych.

Zwrócenie przez Doktorantkę uwagi na czynniki predysponujące do wystąpienia inwazji mają również aspekt praktyczny, ponieważ są cenną wskazówką dla lekarzy weterynarii w przeprowadzaniu procedur diagnostycznych, zwłaszcza w odniesieniu do zwierząt z objawami gastroenterologicznymi.

Dane cytowania obydwu prac w zagranicznych publikacjach, czy wykorzystanie uzyskanych wyników dotyczących *Cryptosporidium* spp. do opracowania metaanalizy światowej prevalencji i czynników ryzyka inwazji *Cryptosporidium* wśród kotów, również świadczą o ich dużej wartości merytorycznej, nie tylko o zasięgu krajowym.

Chcę również podkreślić dotychczasową wysoką aktywność naukową Doktorantki. Oprócz prac wchodzących w skład cyklu, jest również współautorką dwóch artykułów naukowych oraz ośmiu prac popularno-naukowych, opublikowanych w czasopismach dla lekarzy weterynarii. Doktorantka jest autorką i współautorką doniesień konferencyjnych oraz odbyła staż zagraniczny.

W świetle powyższych danych stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska lekarz weterynarii Agnieszki Piekary-Stępińskiej spełnia warunki określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) i dlatego przedkładam wniosek do Rady Dyscypliny Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie lek. wet. Agnieszki Piekary-Stępińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. n. med i n. o zdr. Maria Wesołowska