

dr hab. Jacek Karamon, prof. instytutu
Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych
Państwowy Instytut Weterynaryjny
– Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr. Anny Wilczyńskiej

pt.: „Badania nad epidemiologią kunikulozy u wybranych gatunków zwierząt towarzyszących” (“Epidemiological study on encephalitozoonosis in selected species of companion animals”)

wykonanej pod kierunkiem Promotora rozprawy prof. dr hab. Łukasza Adaszka z Katedry Epizootiologii i Kliniki Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

Encephalitozoon cuniculi (*E. cuniculi*) to obligatoryjny wewnątrzkomórkowy i tworzący zarodniki organizm zaliczany do mikrosporidiów, który może zakażać wiele gatunków ssaków, w tym także ludzi. Patogen ten jest zwykle związany z subklinicznymi zakażeniami, ale może również prowadzić do klinicznej postaci zwanej encefalitozoonozą, czy kunikulozą. Mikrosporydia, do których należy *E. cuniculi* mają dyskusyjną pozycję taksonomiczną. Są uważane za nietypowe, bardzo pierwotne organizmy eukariotyczne ze względu na brak typowych mitochondriów, aparatu Golgiego oraz obecność struktur bliższych prokariotom, takich jak małe rybosomy. Ostatnie badania wskazują na bliskie pokrewieństwo filogenetyczne z grzybami, co zostało potwierdzone analizami sekwencji wielu genów oraz obecnością składników charakterystycznych dla grzybów, np. tubulina i chityna.

Głównym gospodarzem dla *E. cuniculi* są króliki - literatura światowa zawiera liczne badania na temat kunikulozy u tego gatunku zwierząt. Natomiast jeśli chodzi o gryzonie, to poza pojedynczymi pracami, badania w kierunku kunikulozy prowadzone były tylko u zwierząt wolno żyjących. Gryzonie utrzymywane jako zwierzęta towarzyszące mogą stanowić istotne źródło zakażenia dla ludzi mających z nimi bliski kontakt (właściciele, hodowców, lekarzy weterynarii). Pomimo to literatura w tym zakresie jest niezwykle uboga. Dlatego też Doktorantka trafnie identyfikując tę lukę postanowiła uzupełnić ten ważny wycinek wiedzy epidemiologicznej planując i rozpoczynając badania w ramach realizowanego przewodu doktorskiego.

Rozprawę doktorską mgr. Anny Wilczyńskiej stanowi monografia pod tytułem „Badania nad epidemiologią kunikulozy u wybranych gatunków zwierząt towarzyszących” w typowym dla tej formy układzie. Podzielona jest na sześć głównych rozdziałów: 1. Wstęp, 2. Problem badawczy/ hipoteza i cel badań, 3. Materiał i metody, 4. Omówienie wyników badań i dyskusja, 5. Dyskusja, 6. Stwierdzenia i wnioski, 7. Bibliografia. Praca zawiera także Streszczenie i słowa kluczowe w języku polskim i Streszczenie i słowa kluczowe w języku angielskim. Oprócz zasadniczej części rozprawy dokumentacja zawiera także oświadczenia promotora oraz autora pracy i Spis treści. Rozprawa obejmuje 100 stron maszynopisu wraz z 12 rycinami i 26 tabelami. Doktorantka w pracy powołuje się na dane z obszernego piśmiennictwa w liczbie 221 pozycji.

W rozdziale „Wstęp” Doktorantka szczegółowo opisała czynnik etiologiczny kunikulozy – mikrosporidia *E. cuniculi*, przedstawiając na początku pozycję taksonomiczną, budowę i wrażliwość zarodników na warunki zewnętrzne. Następnie przedstawiono kolejne fazy cyklu rozwojowego i typy mechanizmu zakażenia. Doktorantka dokonała przeglądu najważniejszych gatunków z rodzaju *Encephalitozoon*: *E. cuniculi*, *E. intestinalis* i *E. hellem*. Wstęp zakończono informacjami dotyczącymi aktualnej wiedzy na temat występowania *Encephalitozoon* spp. u zwierząt i ludzi.

W następnym rozdziale przedstawione zostały dwa cele badań: 1) Przeprowadzenie oceny sytuacji epizootycznej oraz seroprewalencji choroby w populacji wybranych gryzoni oraz określenie czy mogą one stanowić rezerwuuar patogenu dla ludzi. 2) Przeprowadzenie analizy molekularnej genu ITS *E. cuniculi*, pozwalającej na dokładną identyfikację szczepów pasożytów izolowanych od gryzoni i ludzi z terenów Polski. Zaprezentowano także dwie Hipotezy badawcze: 1) *E. cuniculi* może wywoływać zakażenia u gryzoni. Z łatwością przenosi się na inne gatunki zwierząt towarzyszących oraz na człowieka. Badania mają na celu określenie przebiegu klinicznego encefalitozoonozy u gryzoni domowych oraz ustalenie, czy posiadanie gryzoni stanowi ryzyko rozwoju choroby u ludzi. 2) Domniemuje się, że czynnikiem etiologicznym choroby u gryzoni domowych jest inny szczep *Encephalitozoon cuniculi*, aniżeli izolowany od królików. Aby to potwierdzić konieczne jest przeprowadzenie analizy molekularnej szczepów *E. cuniculi* izolowanych od tej grupy zwierząt, w tym kawii domowych.

W rozdziale „Materiał i metody” Pani mgr Anna Wilczyńska opisała szczegółowo zwierzęta, od których pobierano próbki do badań (kawie domowe, szczury, chomiki, szynszyle, kosztaniczki, myszy). Opisano stan kliniczny zwierząt, ich pochodzenie, wiek, płęć. Przedstawiono także informacje dotyczące ludzi uwzględnionych w badaniach (właścicieli, hodowców i lekarzy weterynarii). Następnie opisano metodykę badań molekularnych. Do detekcji DNA *E. cuniculi* zastosowano metodę real-time opracowaną wcześniej przez zespół współpracujący obecnie z Doktorantką. Przedstawiono sposób przygotowania i badania surowicy metodą ELISA w kierunku specyficznych przeciwciał anti- *E. cuniculi* oraz metody statystyczne użyte do analizy.

Uzyskane rezultaty zostały przedstawione w rozdziale „Omówienie wyników badań i dyskusja”. Analiza wyników PCR wykazała stosunkowo wysoką prewalencję zakażeń *E.*

cuniculi u badanych zwierząt – ogółem 57%, z czego najwyższą zanotowano u kawii domowych – 73%. **Bardzo skrupulatnie odnotowano objawy chorobowe zaobserwowane u badanych zwierząt i skonfrontowano je z wynikami PCR.** Badania ludzi podzielonych na dwie grupy: grupę 1 (28 osób mających kontakt z gryzoniami) i grupę 2 (kontrolną, 20 osób nie mających kontaktu z tymi zwierzętami), wykazały obecność materiału genetycznego *E. cuniculi* u 3 osób z grupy 1. W dalszej części przedstawiono wyniki badań molekularnych oraz analizę filogenetyczną i porównanie uzyskanych sekwencji z sekwencjami referencyjnymi poszczególnych typów pozyskanymi z GenBanku. Wstępna analiza pozwoliła na podział uzyskanych sekwencji na dwie grupy: grupa 1 zawierająca większość próbek od zwierząt i 1 próbkę od człowieka (zbliżona do wcześniej opisanych sekwencji *E. cuniculi*); i grupa 2 wykazująca małe podobieństwo z pozostałymi próbkami, jak i z sekwencjami z Genbanku (zawierająca 2 próbki od ludzi i jedną od kawii domowej).

Na uwagę zasługują fakt, że Doktorantka pokusiła się o bardziej szczegółową analizę danych własnych i referencyjnych, która pozwoliła na wyróżnienie w obrębie 1-ej grupy 6-ciu podgrup (od A do F). Najliczniej reprezentowana w badaniach własnych (19 izolatów) była podgrupa F wykazująca najwyższe podobieństwo ze szczepem referencyjnym klasyfikowanym jako typ I. Pozostałe podgrupy, w których znalazły się sekwencje z badań własnych to: A (2 izolaty) odpowiadająca typowi IV, D (1 izolat) wykazująca homologię zarówno do typu I jak i II, D (3 izolaty) odpowiadający typowi I. Jak widać w próbkach własnych od gryzoni i ludzi nie zidentyfikowano żadnej należącej do typu III (tzw. „szczepu psiego”). **Jednak szczególnie ciekawe w aspekcie dalszych badań genetycznych, być może kontynuowanych w kraju, ale także dla badaczy zajmujących się tym tematem w innych częściach świata, jest identyfikacja odrębnej grupy (grupa 2) genetycznej *E. cuniculi* w próbkach od ludzi i kawii domowej. Jest to bardzo dobry punkt wyjścia do dalszych pogłębionych badań być może z użyciem innych markerów genetycznych.**

Ciekawie przedstawiają się także wyniki badań serologicznych. Spośród 38 próbek od zwierząt pozytywnych w PCR 17 wykazało wynik pozytywny w teście ELISA. Około 2/3 z tych zwierząt wykazywało objawy chorobowe. Badanie surowic pozyskanych od ludzi (48) wykazało przeciwciała anti-*E. cuniculi* u 4 osób – wszystkie były ujemne w PCR. **Fenomen braku korelacji między wynikami PCR i ELISA (czyli obecności DNA patogenu przy braku przeciwciał, i odwrotnie) jest bardzo ciekawy i godny szerszej dyskusji, i być może przyszłych pogłębionych badań.**

W 5-ej części pracy Doktorantka najpierw podsumowuje w 7-u punktach (stwierdzeniach) wyniki swoich badań, a następnie wysnuwa cztery wnioski.

Analiza dokumentacji doktorskiej ujawniła także pewne nieścisłości i elementy wymagające wyjaśnienia, które z obowiązku recenzenta zmuszony jestem przedstawić w formie uwag krytycznych.

1. Tytuł pracy – mógłby być bardziej precyzyjny. Doktorantka poddała badaniom tylko gryzonie (ograniczając się do zwierząt domowych) oraz dodatkowo przeanalizowała

- potencjał zoonotyczny patogenu badając grupę ludzi. Oczywiście, obecne szerokie ujęcie tytułu obejmuje te badania, ale zawężenie jego brzmienia do rzeczywistego celu badań byłoby bardziej adekwatne. Np. Badania nad epidemiologią kunikulozy u wybranych gatunków gryzoni utrzymywanych jako zwierzęta towarzyszące ..” itp. Można to z powodzeniem zrealizować podczas publikacji wyników badań.
2. Streszczenie – Daje się zauważyć pewna dysproporcja w tej części pracy. Mianowicie, ponad połowa tekstu streszczenia to ogólne wiadomości o patogenie (wstęp). Natomiast wyniki praktycznie nie zostały zaprezentowane - jest jedno zdanie odnośnie rezultatów badań, które jest raczej konkluzją. Wskazane byłoby podać odsetki wyników dodatnich itp. Ponadto cel badań w streszczeniu powinien być umieszczony przed metodyką badań (w samym celu określenie „celem było określenie jak szeroko *E. cuniculi* występuje w populacjach wydaje się zbyt kolokwialne, może zamienić to np. na: „ jak bardzo *E. cuniculi* jest rozpowszechniony”)
 3. W streszczeniu pada stwierdzenie, że „zarówno w Polsce jak i na świecie nie prowadzono dotąd badań nad zakażeniami *E. cuniculi* u gryzoni utrzymywanych jako zwierzęta domowe”, które stoi w sprzeczności z literaturą i dalszą częścią dysertacji – w co najmniej jednej publikacji opisano badania, gdzie stwierdzano ten patogen u myszy ze sklepów zoologicznych (na stronie 15 dysertacji jest nawiązanie do tej publikacji wraz cytacją [152])
 4. W opisie typów zakażenia komórek warto opisać w kilku słowach na czym polega zakażenie typu III (kontakt przez izolację) i typu IV (kontakt pośredni), podobnie jak to zrobiono w stosunku do typu I i II..
 5. We wstępie zawarto informację, że „wszystkie dotąd opisane genotypy *E. cuniculi* są zdolne do zakażenia ludzi” (w pierwszych liniach str 11) podczas gdy na poprzedniej stronie (10) jest informacja, że szczep II izolowany jest tylko od gryzoni. Należy to sprostować/ujednolicić.
 6. Na stronie należy zamienić określenie „dzikie myszy” w stosunku do gatunku *Apodemus sylvaticus* na ich właściwą nazwę gatunkową - „myszarka zaroślowa”.
 7. W tabeli 1. zabrakło literaturowych danych odnośnie gryzoni, co wydaje się szczególnie interesujące dla czytelnika w kontekście tematyki pracy [np. cyt. 152...].
 8. Należy ujednolicić zapis dotyczące pobierania próbek krwi do badań serologicznych od zwierząt. W materiale i metodach (str. 20) mamy informację, że zarówno do badań molekularnych jak i serologicznych krew pobierano od wszystkich zwierząt. Natomiast na stronie 31 jest informacja, że „krew do badań serologicznych pobierano od 38 zwierząt dodatnich w PCR.
 9. Proponuję zmodyfikować sposób przedstawienia schematu etapów badania (ryc. 2), obecny schemat może sugerować, że do badań serologicznych trafiały produkty PCR.
 10. Należy opisać parametry zastosowane do analizy sekwencji, jaki model analizy, itp...(3.3.6)
 11. Pewne wątpliwości budzi dobór grupy zwierząt do oceny prewalencji i analizy zależności. Należy być ostrożnym w interpretacji wyników szczególnie dotyczących korelacji między występowaniem objawów chorobowych, a wynikami dodatnimi w kierunku *E. cuniculi*

- a. Po pierwsze – grupa zwierząt badanych była bardzo specyficzna. Były to zwierzęta przyniesione do kliniki weterynaryjnej w znakomitej większości (ok. 75%) chore, z różnymi objawami chorobowymi. W analizie wskazane byłoby uwzględnienie większej liczby zwierząt nie wykazujących żadnych objawów chorobowych (wiadomo, że zwierzęta często są bezobjawowymi nosicielami *E. cuniculi*).
 - b. Po drugie – odczuwalny jest brak danych odnośnie innych badań (niż w kierunku kunikulozy) i diagnoz postawionych poszczególnym zwierzętom przez lekarza weterynarii w Klinice, czy opisano jakieś inne czynniki chorobotwórcze/środowiskowe, które mogły być głównymi/dodatkowymi przyczynami przedstawionych objawów itd. (z pracy można wnioskować że zwierzęta były rutynowymi pacjentami kliniki, a nie grupą zwierząt badanych tylko pod kątem kunikulozy). Uzupełnienie takie w znaczący sposób rozjaśniłoby i urzeczywistniło interpretację wyników badań w kierunku *E. cuniculi*. Należałoby się odnieść do tego faktu także w dyskusji.
12. Wskazane jest wyjaśnienie procesu analizy korelacji pomiędzy występowaniem objawów chorobowych a pozytywnym wynikiem PCR w obrębie grup. Np. uzyskano zaskakująco wysoką korelację pozytywną w tym zakresie u kawii domowych, gdzie stosunek pozytywnych wyników do liczby zwierząt w grupie kawii z objawami (49/65 - 75%) był bardzo podobny jak w grupie kawii bez objawów (24/35 - 68%).
13. Uwagi do Ryciny 8. Analiza sekwencji referencyjnych dostępnych w GenBanku i sposobu ich przedstawienia na rycinie wykazała pewne nieścisłości np.
- a. na rycinie sekwencja KJ941140 zaczyna się od pozycji 60-tej (odnosząc do numeracji na rycinie) . Natomiast w rzeczywistości jest to najkrótsza z użytych sekwencji (226 pz) i porównanie jej możliwe jest dopiero od pozycji 93. Podobnie, w mniejszym zakresie, jest z sekwencją KF736984 gdzie oznaczono obecność nukleotydu „ .” już w pozycji 60tej podczas gdy oryginalnie sekwencja „zaczyna się” dopiero od 61-ej.
14. W dyskusji zabrakło próby wyjaśnienia, dlaczego w większości (21/38) badanych zwierząt pozytywnych w PCR nie stwierdzano przeciwciał w teście ELISA. Ponadto, wyniki uzyskane u ludzi wskazują, że wszystkie wyniki seropozytywne wystąpiły u osób negatywnych w PCR. Stawia to pytanie dotyczące realnej seroprewalencji u zwierząt, u których ograniczono się do badania serologicznego tylko wybranych osobników dodatnich w PCR. Wydaje się, że u zwierząt negatywnych w PCR, analogicznie jak u ludzi, także można się spodziewać znacznego odsetka wyników seropozytywnych. Jest to ciekawy temat do rozwinięcia w dyskusji.
15. We wnioskach zbędne jest powtarzanie szczegółowych wyników badań. Proponuje się usunąć z pierwszego wniosku drugie zdanie odnoszące się do danych procentowych odnośnie prewalencji. Ostatni wniosek powinien być także skrócony (przez usunięcie początkowej części dotyczącej szczegółowych wyników).
16. Podczas analizy monografii stwierdzono także nieliczne błędy natury edytorskiej, wymienione poniżej:

- a. Wg. zaleceń pisowni taksonomicznej kursywa powinna być stosowana tylko do łacińskich nazw gatunkowych lub rodzajowych. Nazwy wyższych poziomów taksonomicznych powinny być pisane czcionką prostą. Np. Encephalitozoonidae - str 6, 10, 11; Arvicolinae str 15 ...
- b. Brak cytacji do informacji dotyczącej prewalencji *E. cuniculi* u gryzoni w Polsce, Czechach i Słowacji (str. 14)
- c. Ostatnie zdanie na stronie 7 (we wstępie), powinno być przeniesione do pierwszego akapitu na tej stronie jako kontynuacja informacji o przeżywalności/wrażliwości zarodników
- d. W tabeli 8 suma wyników dodatnich w przypadku schorzeń tarczycy w rzeczywistości powinna wynosić 4 (jest 3)
- e. Drobne błędy edycyjne w postaci tzw. literówek. np.:
 - i. str. 6 - aerogenną (zamiast : areogenną)
 - ii. str. 11 - odpowiednie do (zamiast: odpowiedniego)
 - iii. brak przecinka przed „u których” str 4 „którym” str 6 ...

Należy podkreślić że, pomimo że Doktorantka nie ustrzegła się podczas redagowania rozprawy pewnych nieścisłości, nie umniejszają one jednak wysokiej wartości naukowej pracy.

Podsumowując, należy stwierdzić, że w przedłożonej rozprawie doktorskiej Doktorantka w bardzo fachowy sposób **zaprezentowała ogólną wiedzę teoretyczną** w zakresie tematyki badań. Sposób zaplanowania i przeprowadzenia opisanych wyżej badań, w tym użycie nowoczesnych metod badawczych, w połączeniu z badaniami klinicznymi i umiejętna analiza wyników, wskazuje na **umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej**. Praca prezentuje także **oryginalne rozwiązanie problemu naukowego** i pokazuje niezwykle ciekawe wyniki istotne z punktu widzenia zdrowia zwierząt jak i zdrowia publicznego (mamy do czynienia z chorobą odzwierzęcą). Doktorantka przeprowadziła unikatowe w skali świata badania w kierunku kunikulozy w grupie gryzoni utrzymywanych jako zwierzęta towarzyszące. Ponadto, w trakcie badań wykryła, przeanalizowała i opisała nowe grupy genetyczne *E. cuniculi*, które z pewnością wzbogacą wiedzę w zakresie zróżnicowania genetycznego tego patogenu.

Reasumując przedstawioną ocenę, uważam, że recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr. Anny Wilczyńskiej pt.: „Badania nad epidemiologią kunikulozy u wybranych gatunków zwierząt towarzyszących” odpowiada w pełni warunkom określonym w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). Wobec wymienionego faktu, przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr. Anny Wilczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

