

Warszawa 10.08.2024 r.

Prof. dr hab. Krzysztof Anusz
Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego
Instytut Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie

Dr hab. Iwona Pazio, prof. uczelni
Przewodnicząca Rady Dyscypliny Weterynaria

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Wilczyńskiej pt. "Badania nad epidemiologią kunikulozy u wybranych gatunków zwierząt towarzyszących"

Zgodnie z uchwałą Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 27 czerwca 2024 r. dokonałem recenzji pracy doktorskiej mgr. inż. Anny Wilczyńskiej pt. „Badania nad epidemiologią kunikulozy u wybranych gatunków zwierząt towarzyszących”.

Rozprawa doktorska autorstwa mgr. inż. Anny Wilczyńskiej podejmuje bardzo ważny, słabo rozpoznany problem zakażeń zwierząt towarzyszących (kawie domowe, szczury, koszatniczki, chomiki, myszy) *Encephalitozoon spp.* – patogenem zaliczanym do grzybów *Microsporidia*. Niezwykle wartościowe jest podjęcie zagadnienia ryzyka przenoszenia tych zakażeń na ludzi, głównie w stanie immunosupresji. Jest to więc praca odwołująca się do kontekstu ochrony zdrowia publicznego. Takie podejście jest jak najbardziej uzasadnione, przede wszystkim ze względu na ogromną popularność gryzoni i królików (u królików prewalencja zakażeń może wynosić nawet 75%) jako zwierząt towarzyszących (zakażenia wśród opiekunów zwierząt, lekarzy weterynarii, hodowców, pracowników i klientów sklepów zoologicznych – osób mających kontakt ze zwierzętami towarzyszącymi). Doktorantka słusznie jednak podkreśla, że spory *Encephalitozoon spp.* są obecne w żywności i utrzymują

żywność nawet w jej formach konserwowanych. Tak więc, podjęty przez Doktorantkę temat dotyczy również zagadnień związanych z bezpieczeństwem żywności pochodzenia zwierzęcego.

Tytuł pracy został sformułowany prawidłowo, adekwatnie do treści.

Doktorantka sformułowała 2 cele badań: przeprowadzenie oceny sytuacji epizootycznej oraz seroprewalencji choroby (kunikulozy) w populacji wybranych gryzoni oraz określenie czy mogą one stanowić rezerwuuar patogenu dla ludzi; przeprowadzenie analizy molekularnej genu ITS *E. cuniculi*, pozwalającej na dokładną identyfikację szczepów izolowanych od gryzoni i ludzi z terenów Polski. Pragnę zwrócić uwagę na bardzo umiejętnie sformułowane, adekwatne do celów badań hipotezy badawcze, wśród których są między innymi odnoszące się do ryzyka rozwoju choroby u ludzi posiadających gryzonie, czy też sugerujące że kunikulozę u gryzoni domowych wywołują inne szczepy *E. cuniculi* niż izolowane od królików.

Plan badań został opracowany prawidłowo, biorąc pod uwagę cele i hipotezy badawcze.

Zwierzęta (157) objęte badaniami były pacjentami Oddziału Drobnych Ssaków przy Klinice Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Lublinie. Pochodziły ze sklepów zoologicznych (111), hodowli (6), adopcji (16), interwencji (7), 17 było nieznanego pochodzenia. W pracy przedstawiono dokładną dokumentację odnoszącą się do powodów zgłoszenia zwierząt do kliniki, a także w podziale gatunkowym listę układów objętych procesem chorobowym.

Badaniami objęto odpowiednią liczbę zwierząt – 157 gryzoni (kawie domowe – 100, szczury – 28, koszatniczki - 4, chomiki – 11, szynszyle – 11, myszy – 3).

Uważam, że niezwykle istotne dla wartości naukowej pracy było objęcie badaniami również ludzi – 28 osób, które miały zawodowo lub prywatnie kontakt z gryzoniami od minimum 2 lat (głównie lekarze weterynarii, w większości z zakładów leczniczych specjalizujących się w leczeniu zwierząt egzotycznych i drobnych ssaków)) oraz 20 osób które nie miały takiego kontaktu (grupa kontrolna). Praca jest jedną z niewielu podejmujących zagadnienia biobezpieczeństwa w weterynaryjnych zakładach leczniczych, ze szczególnym uwzględnieniem specjalizujących się w leczeniu gryzoni. W Polsce w ostatnich latach powstało wiele takich zakładów leczniczych, gdzie prowadzi praktykę lekarsko-

weterynaryjną już około 300 specjalistów chorób zwierząt nieudomowionych. Ta specjalizacja podejmuje zagadnienia dotyczące leczenia i profilaktyki gatunków zwierząt objętych badaniami przeprowadzonymi przez Doktorantkę.

Od zwierząt i ludzi pobierano krew do badań molekularnych obejmujących kolejno izolację DNA, reakcję łańcuchową polimerazy w czasie rzeczywistym (Real-time PCR) z użyciem starterów msp3, msp4a i msp4b komplementarnych do genu ITS (internal transcribed spacer) *Encephalitozoon* spp., umożliwiającą amplifikację odcinka DNA o długości około 300 par zasad, analizę produktów reakcji PCR metodą elektroforezy, przygotowanie produktów reakcji PCR do sekwencjonowania (Serwis Sekwencjonowania i Syntezy DNA Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk), sekwencjonowanie losowo wybranych 32 próbek (produkty PCR) – od 19 kawii domowych, 4 szczurów, 2 chomików, 2 koszatniczek, 2 myszy, 3 ludzi oraz analizowanie sekwencji izolatów własnych *E. cuniculi* i porównywanie ich z sekwencjami *Encephalitozoon* spp. dostępnymi w bazie danych PubMed.

Przeprowadzono również badania serologiczne (ELISA- Medicago) w kierunku wykrywania przeciwciał swoistych dla *E. cuniculi*. Badaniami tymi objęto próbki surowic od 38 zwierząt (3 chomiki, 2 myszy, 3 szczury, 30 kawii), u których badaniem molekularnym wykryto obecność DNA *E. cuniculi* oraz od wszystkich osób zakwalifikowanych do badania.

Wyniki badań poddano ocenie statystycznej z wykorzystaniem testu Fischera oraz metody Spearmana.

Oceniając metodykę badań stwierdzam, że użyto odpowiednie, odpowiadające obecnym standardom metody, które opisano w sposób jasny i merytoryczny.

Doktorantka skrupulatnie wykonywała badania pacjentów przez okres 2 lat. Uzyskała interesujące, unikalne wyniki, a mianowicie spośród 157 przebadanych gryzoni u 89 (57%) uzyskano wynik dodatni PCR, oznaczający zakażenie *E. cuniculi*. Zakażenie stwierdzono u 73% kawii domowych, 9% szynszyli, 36% chomików, 25% szczurów i 50% koszatniczek. Bardzo wartościowe są obserwacje kliniczne, opisane przez Doktorantkę dla poszczególnych gatunków: u kawii domowych z dodatnim wynikiem PCR były to głównie różnorodne zaburzenia układu moczowego, włącznie z niewydolnością nerek, a także u pewnej liczby zwierząt zaburzenia układu nerwowego, pokarmowego, oddechowego, objawy okulistyczne, nadczynność i niedoczynność tarczycy, torbielowatość jajników, zapalenie ucha zewnętrznego; u szczurów guz przysadki, guz jądra i rozsiany proces nowotworowy w jamie

brzuszej, mykopoplazmowe zapalenie płuc, zwyrodnienie kręgosłupa; u chomików ropomacicze, zwyrodnienie kręgosłupa, przewlekła niewydolność nerek, zmiana nowotworowa w obrębie łopatki; u szynszyli silne napady padaczkowe; u myszy biegunka, guzy w okolicy pachy. Analiza statystyczna wykazała u kawii wysoką dodatnią korelację pomiędzy dodatnim wynikiem PCR a występowaniem objawów klinicznych, które mogły być związane z zakażeniem *E. cuniculi*. Zwraca uwagę brak jakichkolwiek objawów klinicznych u koszatniczek z dodatnim wynikiem PCR, a także stwierdzenie nosicielstwo *E. cuniculi* u szczurów nie wykazujących objawów klinicznych. Powyższe wyniki pozwoliły Doktorantce na w pełni uzasadnione stwierdzenia o charakterze zarówno klinicznym, jak i epidemiologicznym. Do zagadnień klinicznych odnosi się stwierdzenie wskazujące na zaburzenia układu moczowego, nerwowego i zmiany okulistyczne, jako najczęściej występujące u zwierząt zakażonych *E. cuniculi*, jak również bardzo istotne w tym kontekście stwierdzenie, że u wszystkich gatunków gryzoni zakażenie może mieć przebieg subkliniczny. Chciałbym podkreślić bardzo starannie przygotowaną przez Doktorantkę i zaprezentowaną w pracy dokumentację kliniczną gryzoni objętych badaniami. Najważniejsze stwierdzenie o charakterze epidemiologicznym informuje, że wśród gryzoni kawie domowe są zwierzętami o najwyższej prevalencji zakażeń *E. cuniculi*.

Tak jak już wspomniałem, bardzo wartościowe i w pełni uzasadnione jest podjęcie przez Doktorantkę zagadnienia ryzyka przenoszenia zakażeń *E. cuniculi* na ludzi. Spośród 28 osób, które zawodowo lub prywatnie miały kontakt z gryzoniami u 3 stwierdzono zakażenie (wynik dodatni PCR). U żadnej z nich nie wykryto w surowicy krwi przeciwciał dla *Encephalitozoon*. U 1 z tych osób często występowało zapalenie oskrzeli. Natomiast badania serologiczne wykazały obecność przeciwciał dla *E. cuniculi* w surowicy 4 lekarzy weterynarii, u których jednocześnie uzyskano ujemny wynik PCR. W pełni zgadzam się z Doktorantką, która zwraca uwagę, że u żadnego z nich nie wystąpiły objawy kliniczne choroby, co wskazuje na zakażenie subkliniczne lub krzyżową reakcję pomiędzy antygenem *E. cuniculi*, a przeciwciałami dla innych gatunków rodzaju *Encephalitozoon spp.* Bardzo interesujące jest wykazanie poprzez analizę statystyczną istotnej zależności pomiędzy rodzajem kontaktu – okazjonalnym u lekarzy weterynarii i stałym u właścicieli zwierząt – a występowaniem dodatniego (u właścicieli zwierząt) lub ujemnego (u lekarzy weterynarii) wyniku PCR. Być może współpraca Doktorantki z lekarzami medycyny, personelem medycznym układała się dobrze. Z moich doświadczeń wynika, że jest to współpraca bardzo trudna. Tym bardziej podkreślam wartość tych badań. Taka współpraca ma podstawowe

znaczenie dla rozwiązywania złożonych, interdyscyplinarnych problemów ochrony zdrowia publicznego.

Analiza wyników badań molekularnych wykazała, że dominującym genotypem *E. cuniculi* odpowiedzialnym za zakażenia był genotyp I. Natomiast porównanie sekwencji 29 losowo wybranych próbek dodatnich dla *E. cuniculi* od zwierząt oraz 3 od ludzi z wzorcowymi sekwencjami *E. cuniculi* z banku genów (GenBank) przy użyciu programu DNA Star MegAligne wykazała podobieństwo w przedziale 91,2-100,0%.

Spośród 38 losowo wybranych zwierząt z dodatnim wynikiem PCR obecność przeciwciał przeciwko *E. cuniculi* stwierdzono u 17 - 13 kawii, 3 chomików, 1 szczura.

Praca zawiera starannie przygotowaną Dyskusję, odwołującą się do odpowiednio wyselekcjonowanej literatury światowej. Doktorantka zawarła w Dyskusji oryginalne, głęboko przemyślane, oparte na szerokiej wiedzy stwierdzenia. Pozytywną ocenę niektórych z nich zawarłem w recenzji. Mam uwagę do Wstępu pracy, który moim zdaniem powinien rozpocząć się podrozdziałem Wprowadzenie, w skrócie informującym o wszystkich aspektach złożonego problemu kunikulozy. Streszczenie, nawet bardzo dobrze przygotowane, nie wypełnia tego zadania. Jednocześnie bardzo dobrze oceniam podrozdziały Wstępu (Czynnik etiologiczny, Patomechanizm zakażenia, Przegląd najważniejszych gatunków *Encephalitozoonidae*, Występowanie *Encephalitozoon* spp. u zwierząt), które prezentują najbardziej aktualną wiedzę oraz są przygotowane bardzo starannie pod względem edytorskim.

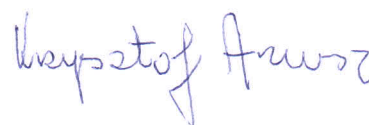
Pracę finalizują 4 jasno sformułowane, jednoznaczne wnioski, bezpośrednio wynikających z wyników badań. Wnioski rozszerzają wiedzę nt. epidemiologii kunikulozy u wybranych gatunków zwierząt towarzyszących, z uwzględnieniem zagrożenia zoonotycznego. Szczególnie pragnę podkreślić znaczenie wniosku wskazującego na zagrożenie zakażeniami *E. cunicoli* u właścicieli gryzoni. Ta informacja, przekazywana przez lekarzy weterynarii właścicielom, ma ważne znaczenie dla ochrony zdrowia publicznego.

Podsumowując stwierdzam, że uzyskane przez Doktorantkę wyniki stanowią oryginalny i istotny wkład do krajowego i międzynarodowego piśmiennictwa. Rozprawa doktorska autorstwa mgr. inż. Anny Wilczyńskiej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki, a także Jej umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy badawczej. Tym samym praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim i odpowiada warunkom określonym w Ustawie z dnia 20

lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.).

W związku z powyższym przedstawiam Radzie Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej oraz dopuszczenie jej Autorki - mgr. inż. Anny Wilczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na interdyscyplinarny charakter badań, obejmujących zagadnienia ochrony zdrowia publicznego, ich wysoką wartość merytoryczną, wnioskuję o wyróżnienie ocenianej pracy doktorskiej.



Prof. dr hab. Krzysztof Anusz