

dr hab. Grzegorz Karbowski, prof. IP PAN
Instytut Parazytologii im. Witolda Stefańskiego PAN
ul. Twarda 51/55, 00-818 Warszawa

Ocena rozprawy doktorskiej pani mgr Wioletty Rożej-Bielickiej pt. „Ocena rozpowszechnienia pierwotniaków z rodzaju *Babesia* w wybranych regionach Polski przy zastosowaniu technik molekularnych”

W przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej p. mgr Wioletty Rożej-Bielickiej „Ocena rozpowszechnienia pierwotniaków z rodzaju *Babesia* w wybranych regionach Polski przy zastosowaniu technik molekularnych” postawiono sobie za cel rozpoznanie obecnej sytuacji epidemiologicznej babeszjoz w Polsce, i opracowanie skutecznej i szybkiej metody diagnostycznej. Jako cele dodatkowe, obrano ocenę częstości występowania pierwotniaków z rodzaju *Babesia* w środowisku naturalnym oraz u towarzyszących człowiekowi psów i kotów. Wyniki pracy mają więc z założenia charakter praktyczny, do wykorzystania w diagnostyce babeszjoz u ludzi, mniejsze znaczenie ma przydatność otrzymanych wyników dla poszerzenia wiedzy w zakresie badań podstawowych.

Wybór tematu badawczego uważam za trafny, chociaż ryzykowny – autorce udało się znaleźć interesującą „lukę” w parazytologii lekarskiej. Rozprawa dotyczy pasożytów o szerokim zasięgu, a mimo to mało poznanych. Ważne jest zwrócenie uwagi na możliwość obecności u człowieka trzech gatunków babeszji – *Babesia microti*, *B. divergens*, *B. venatorum*. Gatunki te z reguły nie są rozróżniane w praktyce klinicznej, co podkreśla wartość opracowanej przez Autorkę metody diagnostycznej obejmującej je wszystkie. Potencjalne zagrożenie dla krwiodawstwa i pacjentów poddanych transfuzji krwi podnosi wagę problemu babeszjozy w Polsce. Pracę można też uznać za odpowiedź na wyolbrzymiony medialnie problemem kleszczy i chorób odkleszczowych. Z drugiej strony, babeszje są pasożytami dość rzadkimi w Polsce. Autorka podejmując ten temat ryzykowała, że mogła podczas badań nie trafić nawet na jeden prawdziwy przypadek babeszjozy u człowieka. Jak sama pisze, w Europie potwierdzono dotąd tylko 50 przypadków babeszjozy u ludzi, w Polsce tylko kilka przypadków, z reguły bezobjawowych. Nie ma możliwości stwierdzić, ile przypadków zostało nierozpoznanych bądź rozpoznanych błędnie. Diagnostyki wykonywane przez prywatne laboratoria nie zawsze są wiarygodne, ich wyniki często są kwestionowane przez specjalistów.

Rozprawa liczy 124 strony, ma klasyczny podział na rozdziały – wstęp, cele pracy, materiały i metody, wyniki i omówienie wyników, piśmiennictwo. Te części zostały jeszcze uzupełnione o wykaz zastosowanych skrótów, tabel i ilustracji. Zgodnie z wymogami formalnymi zawartymi w Art. 13, p. 6 Ustawy o Stopniach i Tytułach Naukowych (Dz. U. Nr 65, poz. 595), Autorka zamieściła streszczenie rozprawy w języku angielskim. Praca uzupełniona jest o 30 tabel i 26 ilustracji, pomocnych w zrozumieniu treści.

Praca napisana jest poprawnym językiem, zamieszczone tabele i wykresy wykonane są starannie; nieliczne błędy, które wymienię w dalszej części oceny, nie wpływają znacząco na jej wartość.

Wstęp zawiera uzasadnienie celu pracy, oparte na gruncie sytuacji epidemiologicznej babeszjoz na świecie, oraz podrozdziały, omawiające pierwotniaki *Babesia* jako czynnik chorobotwórczy, obraz kliniczny babeszjoz, epidemiologię i stosowane powszechnie metody diagnostyczne. W uzasadnieniu celu badań Autorka podkreśla, oprócz już wspomnianych powyżej problemów, ograniczenia stosowanych dotychczas metod diagnostycznych opartych o rozmazy krwi i wykrywanie obecności specyficznych przeciwciał. Nasuwa się przy tym pytanie – czy stosowane dotychczas metody, oraz test opracowany przez Autorkę, były i mogą być użyte do badania krwi zdeponowanej w Banku Krwi, kiedy istnieje obawa że dawca mógł być zarażony? Może to jest jeszcze jeden sposób na praktyczne wykorzystanie wyniku? Przy opisie przebiegu choroby przydałoby się podać cechy odróżniające babeszjozę od malarii, tym bardziej, że Autorka sama wspomniała o błędnych diagnozach na stronie 25. Szczegółem, na jaki zwróciłem uwagę, jest zerwanie przez Autorkę z mitem „krzyża maltańskiego” przy opisie pasożyta. Ta forma morfologiczna jest powszechnie powtarzana w opracowaniach przeglądowych jako cecha charakterystyczna dla rodzaju *Babesia*, natomiast w praktyce spotykana jest bardzo rzadko.

Autorka nie ustrzegła się jednak błędów we wstępie do rozprawy. W podrozdziale 1.1., jako pierwsze rejony w Europie gdzie zaobserwowano babeszjozę podaje Francję i Kaukaz, który geograficznie należy już do Azji. Nazwisko Viktora Babeşa należy pisać z użyciem litery alfabetu rumuńskiego ș (s z przecinkiem), wymawianej podobnie do polskiego „sz”, co jest zresztą uzasadnieniem wymowy nazwy pasożyta jako „babeszja”. Na stronie 11 Autorka podała informację, że żywicielem jest kleszcz, przeważnie z rodzaju *Ixodes*. Zaprzecza temu już na dalszych stronach, oraz w tabeli 1, gdzie wymienione są inne rodzaje kleszczy, będące żywicielami dla babeszji. Na stronie 13 podana została informacja, że kompleks apikalny uczestniczy w zlewaniu się gamet, a jako źródło wskazano opracowanie Wong i wsp. 2007. Opracowania na które Autorka się powołuje nie znalazłem w spisie

literatury, a w pozycji tego samego autora z roku 2008 takiej informacji nie ma. Rysunek 1, przedstawiający schemat budowy merozoitu, uważam za zbyt powierzchowny; rysunek elementów kompleksu apikalnego wygląda na zaczerpnięty z przekroju poprzecznego, i na tle komórki nieprawidłowo zorientowany względem jej osi. Na stronie 22, przy opisie babeszjozy psów brak informacji o *Babesia gibsoni*, mimo że gatunek jest uwzględniony w tabeli zbiorczej. Na str. 23 Autorka napisała, że *Ixodes ricinus* występuje pospolicie na całej półkuli północnej. Jest to nieprawda, gatunek ten występuje tylko w europejskiej części strefy Palearktycznej. Być może Autorka miała na myśli cały kompleks *Ixodes persulcatus*, określane także jako *I. ricinus*, obejmujący gatunki kleszczy z podrodzaju *Ixodes*, występujące na półkuli północnej w strefach Palearktycznej i Nearktycznej, zbliżone morfologicznie i przenoszące podobne zestawy patogenów. Nie zgadzam się też ze stwierdzeniem, że na obszarze Polski znaczącą rolę w transmisji babeszji odgrywają kleszcze *Dermacentor marginatus*, *Haemaphysalis punctata*, *Rhipicephalus sanguineus* i *Ixodes hexagonus*. Są to kleszcze w naszym kraju albo rzadko spotykane, albo rzadko atakujące człowieka. Na stronie 33 polskie nazwy kleszczy zostały zamienione.

Zastrzeżenie mam też do informacji z podrozdziału 1.4. Autorka podaje, że u osób po splenektomii liczba zarażonych erytrocytów dochodzi do 85%. Tak wysoka intensywność zarażenia wydaje się mało realna. Być może Autorka trafiła na opis zarażenia oparty na fałszywie zinterpretowanym obrazie spod mikroskopu, niestety, nie mogłem zweryfikować tej informacji, bo w podanym źródle (Wormser i wsp. 2010) jej nie ma.

Rozdział drugi zawiera podane w skrócie założenia pracy, oraz zadania szczegółowe wiodące do określonego we wstępie celu; pierwszy i najważniejszy cel to opracowanie metodyki molekularnej do wykrywania pierwotniaków z rodzaju *Babesia*; podane są też trzy dalsze, ale one można powiedzieć są realizowane przy okazji. Celowość badania występowania babeszjoz u psów i kotów początkowo budzi wątpliwości, ale potrzeba opracowania metody diagnostycznej uniwersalnej dla wielu gatunków pasożyta w pełni ją uzasadnia.

W rozdziałach trzecim i czwartym opisane zostały materiały i metody. Autorka starannie dobrała materiał kontrolny, obejmujący izolaty DNA z trzech gatunków *Babesia*, występujących w Polsce, w tym dwa potencjalnie patogenne dla człowieka, i jako kontrole negatywne izolaty DNA z człowieka, kleszczy i zwierząt towarzyszących, plus próba z wody. Zwraca uwagę trafny dobór grupy badawczej i jej wielkość (łącznie przebadano ponad 4700 kleszczy, 300 prób ze zwierząt i 480 z ludzi), co pozwala uzyskać wyniki istotne statystycznie i uzasadnia wyciągnięcie wniosków natury ogólnej. Jako materiał diagnostyczny posłużyły

izolaty DNA z kleszczy pospolitego i łąkowego, krwi psów i kotów, oraz prób krwi od myśliwych. Materiał badawczy od zwierząt i ludzi był uprzednio zbierany w ramach grantów badawczych, co świadczy o spełnieniu obowiązku uzyskania zgody przez Komisję Etyczną. Jedyne zastrzeżenie dotyczy braku informacji o metodyce zbioru kleszczy. Można się domyślać, że były zbierane metodą flagowania, lecz w tym wypadku nie wiadomo w jaki sposób znalazły się wśród nich nimfy kleszcza łąkowego.

Metodyka badań jest prawidłowo dobrana do założonych celów. Obejmuje zarówno tradycyjne metody opisowe, oparte na przygotowaniu preparatów mikroskopowych i metodach mikroskopii świetlnej, jak i nowoczesne metody oparte o techniki biologii molekularnej i genetyki – metody amplifikacji wybranych genów z wykorzystaniem reakcji PCR w wersji multiplex, sekwencjonowanie otrzymanych fragmentów DNA. Zwieńczeniem pracy jest opracowanie własnej metodyki diagnostycznej, opartej o samodzielnie zaprojektowane startery i reakcję Real-time PCR z analizą krzywych topnienia DNA. Każdy etap pracy jest szczegółowo opisany, co pozwala na jej powtórzenie przez inne laboratorium. Do tej części rozprawy nie mam żadnych zastrzeżeń.

Rozdział „Wyniki” zawiera opis rezultatów przeprowadzonych obserwacji i badań. Zaczyna się od opisu specyficzności i czułości opracowanego testu badawczego. Autorka podaje zarówno czułość teoretyczną (wykrycie 20 kopii fragmentu genu), jak i praktyczną (200 kopii). Specyficzność gatunkową pasożyta pozwala określić reakcja multiplex PCR, krzywe fluorescencji oraz topnienia produktów reakcji, co jest przedstawione zarówno w opisie, jak i na wykresach. Ocenę częstości występowania zarażeń *Babesia* u ludzi trudno oprzeć o jeden wynik pozytywny, ale jak wcześniej wspomniałem, ten jeden to i tak dużo. W przypadku kleszczy pierwotniaki wykryto u 1,26% kleszczy pospolitych, oznaczono je metodą sekwencjonowania jako *Babesia* szczep EU1, *B. canis* i *B. capreoli*. Nie wykryto babeszji u kleszczy łąkowych. Ten pierwszy wynik jest zbliżony do podawanych przez innych badaczy; zastanawia brak obecności *B. canis* u kleszczy łąkowych; być może przyczyną jest zbyt niska ich liczba – 102, i przy większej próbie były wykryte. Opis wyników uzupełniony został o starannie wykonane tabele i wykresy. Uzyskane sekwencje zostały zdeponowane w GenBanku, opracowaną metodę diagnostyczną zgłoszono do opatentowania. Uzyskane wyniki i ich interpretację uważam za prawidłowe.

Rozdział 6 obejmuje omówienie wyników badań, podzielony jest na 4 podrozdziały zgodne z wykazanymi w rozdziale 2 celami pracy. Opracowana przez Autorkę metoda diagnostyczna poddana jest krytycznej analizie, wykazane są zarówno jej zalety, jak i ograniczenia względem dotychczas stosowanych metod badawczych. Opracowany przez

Autorkę test góruje nad innymi czułością i wydajnością reakcji, i zgodnie z założeniem umożliwiła identyfikację gatunku pasożyta nawet przy niskiej intensywności zarażenia. Pozwala też od razu określić gatunek pasożyta. Podrozdział 2 omawia częstość występowania zarażeń *Babesia* wśród osób ryzyka; oprócz opisu wykrytego zarażenia przez *B. venatorum*, zawiera przegląd epidemiologii babeszjoz w Europie i analizę zagrożenia dla krwiolecznictwa. Podrozdział 3 zawiera dyskusję nad występowaniem babeszji w środowisku naturalnym; zanalizowane zostały wyniki badań kleszczy, na tle danych podawanych przez innych autorów. Podobny charakter ma podrozdział 4, omawiający wyniki uzyskane z badań prób krwi z psów i kotów. Wnioski w obydwu podrozdziałach poparte zostały testem statystycznym. Trochę naciągana wydaje mi się korelacja zachorowań psów z warunkami meteorologicznymi, chociaż test statystyczny ją wykazał. Pogoda ma bezpośredni wpływ na aktywność kleszczy, ale na czas wystąpienia objawów u psa już mniejszy. Potencjalną korelację zaciera zmienny okres inkubacji choroby, zależny od kondycji i wieku psa i liczby pasożytów przekazanych przez kleszcza, którego żerowanie najczęściej jest brutalnie przerwane przez właściciela. Istnieją też przypadki utajonej babeszjozy, która objawia się dopiero po długim czasie przy okazji spadku odporności żywiciela. Należy też uwzględnić fakt, że przy sprzyjającej pogodzie właściciele chętniej i dłużej przebywają z psami na terenach zielonych, przez co ryzyko spotkania z zarażonym kleszczem wzrasta. Nie uważam jednak wykazania tej korelacji za błąd, ale za punkt do dyskusji.

W całym rozdziale Doktorantka wykazała się dużą znajomością problematyki i literatury związanej z celami pracy i umiejętnością wyciągania wniosków zarówno szczegółowych, jak i natury ogólnej.

Rozdział 7 – wnioski – zawiera ujęte w pojedynczych zdaniach wyniki pracy, które w rzeczy samej pozwalają na szybką pozytywną ocenę rozprawy. Rozdziały 8 i 9 zawierają streszczenia rozprawy po polsku i po angielsku, zawierające zarys problemu, analizę skuteczności dotąd stosowanych metod diagnostycznych babeszjozy jak i własnej.

Spis piśmiennictwa zawiera 177 pozycji, jest więc obszerny i przypuszczalnie wyczerpujący temat. Zwraca uwagę znajomość także polskiej literatury, w tym pozycji spoza łatwo dostępnych w Internecie baz danych.

Rozdziały 11 i 12 stanowią wykazy tabel i ilustracji.

Autorka nie ustrzegła się w całości pracy drobnych usterek, typowych dla szerokich opracowań. Są to literówki i przestawienia znaków, np. na stronie 9, 10 i 11 widnieje nazwa *Babesia bigemina*, zamiast *bigemina*. Na stronie 20 pojawiła się błędna nazwa *Theiliera*. Przypuszczam że duża część tych jest błędów spowodowana została przez autokorektę

edytora tekstu. Autorka używa znaku x w znaczeniu mnożnika; jest to relik z czasów maszyn do pisania, w dobie edytorów tekstu lepiej używać znaku × (oznaczonego w standardzie Unicode jako 00D7). Odmienne podejścia wymagają wyrażenia typu „gospodarz”, zamiast prawidłowego polskiego terminu „żywiciel”, oraz „inwazja”, zamiast „zarażenie”. Do niedawna można by uznać je za błędne, jednak ich coraz szersza powszechność sugeruje, że są one efektem ewolucji języka, i należy je zaakceptować. Usterki te jednak nie mają wpływu na wartość merytoryczną rozprawy.

W podsumowaniu oceny stwierdzam, że przedstawiona mi rozprawa wnosi do parazytologii cenne informacje o epidemiologii i diagnostyce babeszjoz. Szczegółowy opis opracowanej metody diagnostycznej, wykazanie jej słabych punktów oraz zalet, wykazuje zasadność jej rozpropagowania i wykorzystania w praktyce klinicznej.

Wniosek końcowy

Moja ocena rozprawy doktorskiej mgr Wioletty Rożej-Bielickiej pt. „Ocena rozpowszechnienia pierwotniaków z rodzaju *Babesia* w wybranych regionach Polski przy zastosowaniu technik molekularnych” jest jednoznacznie pozytywna. Wartość naukowa przeprowadzonych badań i ich opracowanie w formie dysertacji, spełniają warunki stawiane przed rozprawami doktorskimi, i wobec tego wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Wioletty Rożej-Bielickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę odwagę Doktorantki do zajęcia się mało znanym tematem oraz opracowanie nowego testu diagnostycznego przydatnego w praktyce klinicznej, wnoszę o przedstawienie tej pracy do wyróżnienia

Warszawa, 9.11.2015 r.

A. Karbowick