



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Zakład Biologii Ogólnej i Parazytologii

Warszawa, 17 listopada 2015 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr **Wioletty Rożej-Bielickiej**

p.t.

„Ocena rozpowszechnienia pierwotniaków z rodzaju *Babesia* w wybranych regionach polski przy zastosowaniu technik molekularnych”

Podstawą do sporządzenia niniejszej recenzji jest pismo prof. dr hab. Mirosława J. Wysockiego Dyrektora NIZP-PZH oraz prof. dr hab. Krzysztofa Chomiczewskiego Przewodniczącego Rady Naukowej NIZP-PZH, z dnia 4 września 2015 roku.

Recenzowana rozprawa została przygotowana w Zakładzie Parazytologii Lekarskiej NIZP-PZH pod kierunkiem dr hab. n. med. Elżbiety Gołąb prof. NIZP-PZH. W części merytorycznej obejmuje dziewięć rozdziałów (Wstęp, Cele Pracy, Materiał, Metody, Wyniki, Dyskusję, Wnioski oraz Streszczenie w języku polskim i angielskim) i zawiera się na 108 stronach. Część uzupełniającą stanowi Wykaz stosowanych skrótów, Piśmiennictwo – obejmujące 177 pozycji (w większości anglojęzycznych), Wykaz tabel i Spis ilustracji. Całość rozprawy zawiera się na 124 stronach.

Na podstawie rozprawy doktorantka aplikuje o stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej. Zgodnie z wymaganiami ustawowymi rozprawa doktorska powinna stanowić oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wykazywać ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w danej dyscyplinie naukowej, a także umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Mając to na uwadze przyjąłem kryteria oceny dostosowane do wymagań stawianych rozprawom doktorskim.

Doktorantka trafnie wybrała temat i problem badawczy podjęty w rozprawie. Prezentowane badania doskonale wpisują się w aktualne trendy i tendencje naukowe. Coraz częściej, w różnych aspektach zwraca się uwagę na liczne pasożyty człowieka, szczególnie te, które należą do tak zwanych „emerging” i/lub „neglected diseases”. Babeszjoza człowieka jest stosunkowo nową i słabo poznaną jednostką wśród chorób zakaźnych. Powodowana jest przez pasożytyjące w krwinkach

pierwotniaki z rodzaju *Babesia*. Choroba ta najczęściej przenoszona jest przez wektory, którymi są kleszcze (choroba odkleszczowa), jednak coraz częściej notowane są transmisje patogenu dokonane podczas transfuzji krwi, transplantacji narządów od zarażonych dawców lub drogą przełożyskową. Najczęstszą przyczyną babeszjozy u człowieka jest *Babesia microti*, a najwięcej przypadków klinicznych zostało stwierdzonych we wschodnich i środkowozachodnich regionach Stanów Zjednoczonych. Pasożyt ten był także sporadycznie notowany w innych krajach świata. Objawowo inwazja *Babesia* jest trudna do odróżnienia od objawów towarzyszących, np. infekcji wirusowej, a dając objawy grypopodobne jest często mylnie diagnozowana. Z tego względu, szczególnie w grupach ryzyka, mogą rozwijać się komplikacje, a nierozpoznana babeszjoza może prowadzić do śmierci. Poza *B. microti* u człowieka stwierdzano także inne gatunki oraz genotypy tego pierwotniaka. Przebieg inwazji nie jest jednakowy i zależy od wielu czynników, w tym statusu immunologicznego żywiciela oraz gatunku pierwotniaka. Skorelowanie przebiegu klinicznego w zależności od gatunku pasożyta może mieć spore znaczenie w praktyce klinicznej. Niezbędne jest do tego odpowiednie oznaczenie gatunku i/lub genotypu oraz oszacowanie zagrożeń środowiskowych. Dlatego podjęcie tego tematu przez doktorantkę uważam za w pełni uzasadnione i oparte na rzeczywistej potrzebie nie tylko poznawczej, ale i praktycznej.

Doktorantka postawiła sobie cztery cele badawcze. Pierwszym jest opracowanie metodyki molekularnej do wykrywania i różnicowania pierwotniaków z rodzaju *Babesia*. Należałoby tu sprecyzować, że celem jest opracowanie nowych metod, mogących mieć zastosowanie w diagnostyce i różnicowaniu molekularnym, gdyż inne metody już istnieją. Cel ten jest jak najbardziej poprawny, a jego osiągnięcie jest stałym wkładem doktorantki w naukę i może mieć znaczenie praktyczne, zwłaszcza że przebieg kliniczny babeszjozy zależy od gatunku pasożyta. Kolejne trzy cele wiążą się z oceną częstości występowania pasożyta w środowisku naturalnym, u osób z wybranych grup ryzyka oraz psów i kotów. Cele te mają wartość poznawczą, jednak ich znaczenie byłoby znacznie większe gdyby rejony badawcze się ze sobą pokrywały. Mimo to, cele te są prawidłowo sformułowane, a ich realizacja z pewnością uzupełnia wiedzę na temat występowania *Babesia* w Polsce. Cel czwarty powinien zostać doprecyzowany, gdyż doktorantka nie objęła swoimi badaniami całego województwa mazowieckiego a jedynie 5 z 42 powiatów (wliczyłem tu miasta na prawach powiatu).

Praca doktorska mgr Wioletty Rożej-Bielickiej ma typową strukturę. Rozpoczyna się od wykazu skrótów. Następnie doktorantka prezentuje, we wstępie, przegląd dostępnej literatury, po czym przechodzi do prezentacji swoich oryginalnych wyników badań, które dyskutuje w rozdziale „Dyskusja” z odpowiednio dobranymi pozycjami literaturowymi (głównie obcojęzycznymi). Całość części merytorycznej rozprawy zamykają wysunięte przez doktorantkę wnioski oraz krótkie podsumowanie. Bibliografia zawiera 177 pozycji, a sama literatura jest wyważona, dostosowana do tematyki rozprawy i dobrana prawidłowo.

Pozwolę sobie na pominięcie dokładnego opisu zawartych w rozprawie treści i ograniczenie się do najważniejszych uwag, co wynika bezpośrednio z powierzonej mi roli i jest istotą recenzji pracy naukowej.

We „Wstępie” doktorantka przybliży istniejący stan wiedzy dotyczący pierwotniaków z rodzaju *Babesia* i babeszjozy. Rozdział ten zajmuje niemal ¼ całości merytorycznej pracy i jest częścią stosunkowo obszerną, zawartą na 23 stronach (dla porównania Dyskusja zajmuje 12 stron). Wstęp dość dobrze wprowadza czytelnika w zagadnienie, mam jednak kilka uwag lub wątpliwości, które, mam nadzieję, zostaną w przyszłości wzięte pod uwagę lub wyjaśnione w trakcie publicznej obrony. Na końcu tego rozdziału doktorantka powinna była zawrzeć stawiane hipotezy badawcze, które *nota bene* nie są wyraźnie podkreślone w pracy, i wówczas zaprezentować cele, których realizacja służy do weryfikacji stawianych założeń.

Wstęp zawiera liczne, różnorodne i ciekawe informacje, jednak moim zdaniem mogłyby one zostać przedstawione przejrzysiej i konsekwentniej. Pewien chaos, jaki panuje w tym rozdziale utrudnia zapoznanie się z treścią. Odnoszę wrażenie, że niektóre fragmenty/podrozdziały wstępu można byłoby połączyć, np.: podrozdział 1.3 „Rozpowszechnienie zarażeń...” zawiera liczne fakty istotne z punktu widzenia klinicznego i epidemiologicznego, które z powodzeniem mogłyby zostać zaprezentowane razem z wcześniejszym podrozdziałem „1.2.” „Obraz kliniczny...”. Doktorantka uniknęłaby w ten sposób rozproszenia informacji, a praca stałaby się łatwiejsza w odbiorze. Obecnie część faktów ogólnych prezentowana jest w jednej części wstępu, a ich bardziej szczegółowe omówienie w zupełnie innej.

Rozpoczynając „Wstęp” doktorantka stwierdza, że „pasożyt ten jest szeroko rozpowszechniony na całym świecie”, czy tak jest jednak w rzeczywistości? Wydaje mi się, że należałoby doprecyzować, co dokładnie doktorantka miała tu na myśli i opisać sytuację epidemiologiczną i rozprzestrzenienie pasożyta w świecie, biorąc pod uwagę uwarunkowania klimatyczne i geograficzne, a także występowanie wektorów *Babesia*.

Dalej doktorantka wymienia potencjalne czynniki etiologiczne babeszjozy, nie wspomina jednak tu o przypadkach wywołanych przez szczepy WA1, CA1 i MO1, choć z pewnością warto byłoby o nich napisać parę słów. Informacja ta pojawia się pobieżnie dopiero pod koniec rozdziału.

Od początku licznie stosowany jest historyczny termin „piroplazmy”, ale brak jest wyjaśnienia wcześniej, czym one są. Wprowadzenie takie powinno było się pojawić na początku pracy, po pierwszym użyciu terminu, a znajdujemy je dopiero w kolejnym podrozdziale.

W opisie dotyczącym biologii pasożyta doktorantka wspomina o kleszczach z rodzaju *Ixodes*, odgrywających rolę wektorów. Wydaje mi się, że cenną informacją byłoby wymienienie poznanych już gatunków oraz zaznaczenie ich zasięgu geograficznego (mapka), co pozwoliłoby na oszacowanie występowania potencjalnego ryzyka, zwłaszcza w tych częściach świata, w których dotychczas

babeszjoza ludzka nie była notowana, a wektory są spotykane. Ogólna informacja dotycząca tego zagadnienia pojawia się w późniejszych częściach wstępu.

Do zilustrowania cyklu życiowego pierwotniaka aplikantka użyła grafiki zamieszczonej na stronie internetowej CDC. Moim zdaniem grafika ta jest uproszczeniem zachodzących przemian. Należałoby przedstawić dokładniejszy, własnoręcznie opracowany schemat cyklu życiowego, zawierający dodatkowe, szczegółowe informacje. Również opis dotyczący procesów zachodzących w organizmie kleszcza zawiera pewne nieścisłości. Doktorantka nie wspomina o inwazji pasożyta do komórek jelita kleszcza, a następnie do jego hemolimfy itd., co ma znaczenie dla dalszego zrozumienia wielu procesów związanych z epidemiologią babeszjozy. Tym bardziej, że cykl życiowy *Babesia* został dokładnie opisany, np. w cytowanej przez doktorantkę pracy autorstwa Mary J. Homer opublikowanej w *Clinical Microbiology Reviews*.

Opisując obraz kliniczny informacja dotycząca grupy pacjentów narażonych na ostry, zagrażający życiu przebieg (np. pacjenci po splenektomii), pojawia się w środku podrozdziału. Moim zdaniem powinna ona znaleźć się na początku.

Warto podkreślić zwrócenie uwagi na poruszany przez mgr Rożej-Bielicką obowiązek zgłaszania przypadków babeszjozy w USA. Jak słusznie zauważa, takiego obowiązku w Polsce nie ma, choć przebyta babeszjoza wyklucza pacjenta z grona dawców krwi. Prawdopodobnie wynika to z nielicznej grupy chorych, u których stwierdzono kliniczną babeszjozę. Jest to jednak problem, który doktorantka słusznie podnosi, a samo zgłaszanie przypadków tej parazytozy z pewnością powinno być wzięte pod uwagę.

Rysunek 6 przedstawiający algorytm postępowania w przypadku podejrzenia babeszjozy powinien znaleźć się za stroną nr 30, na której jest po raz pierwszy cytowany, a nie przed nią. Analogiczna uwaga dotyczy rysunku nr 7.

Rozdziały „**Materiał**” i „**Metody**” są bardzo szczegółowo opisane i dodatkowo zilustrowane tabelami i rycinami. Metody zostały dobrane odpowiednio do zaplanowanych w pracy zadań badawczych i postawionych celów. Mam jedną zasadniczą uwagę, mianowicie uzyskane wyniki miałyby większy ciężar gatunkowy, gdyby zarówno materiał pobierany z kleszczy, zwierząt towarzyszących i ludzi pochodził z podobnych lub tych samych regionów oraz obejmował większą część terytorium Polski. Warto w przyszłości pomyśleć o rozszerzeniu obszaru badań i włączenie do analiz innych grup ryzyka.

W tym rozdziale kilkakrotnie ryciny i tabele pojawiają się przed ich zacytowaniem w tekście. Nie jest to zasadniczy błąd i taka praktyka pojawia się w niektórych publikacjach, jednak umieszczanie ilustracji przed ich zacytowaniem utrudnia zapoznawanie się z treścią pracy i należałoby tego unikać.

Rozdział „Wyniki” przedstawia oryginalne osiągnięcia doktorantki i został bogato zilustrowany, bardzo licznymi tabelami i grafikami. Ułatwia to zapoznanie się z rezultatami badań. Rozdział ten nie budzi moich większych zastrzeżeń, a przedstawione wyniki są znacznie bogatsze niż wynikałoby to z tytułu rozprawy. Drobną uwagą dotyczy zamieszczonych zdjęć (str. 74), dla których autorka nie podaje skali.

Wymierną korzyścią przeprowadzonych badań jest złożenie wniosku patentowego dotyczącego jednoczesnego wykrywania i identyfikacji wybranych gatunków *Babesia*. Wniosek patentowy jest efektem prowadzonych badań, a nie wynikiem samym w sobie i jako taki nie powinien znaleźć się w rozdziale „Wyniki”.

Rezultaty badań krwi kotów powinny być zróżnicowane na zwierzęta wychodzące i utrzymywane na stałe w „zamknięciu”. Wiele kotów przebywa w mieszkaniach swoich właścicieli i nie wychodzi na zewnątrz, w związku z tym nie mają szans na kontakt z kleszczami, a tym samym zostać zarażone. W przyszłości należałoby przeprowadzić badania skupiając się na kotach dzikich i wychodzących, wówczas byłyby one rzeczywistym odzwierciedleniem stanu zarażenia w populacji tych zwierząt.

Cennym wynikiem, który należy podkreślić, jest stwierdzenie inwazji mieszanych pierwotniaków z rodzaju *Babesia*, może to mieć znaczenie dla praktyki klinicznej i wpływać na przebieg zarażenia oraz obraz towarzyszących inwazji objawów.

Dużym osiągnięciem doktorantki jest uzyskanie unikalnych rezultatów, które pozwoliły na opracowanie testu pozwalającego na różnicowanie gatunków *Babesia* bez konieczności sekwencjonowania (podstawa do złożonego wniosku patentowego).

Dyskusja, zawarta na 12 stronach, obejmuje odniesienie uzyskanych przez doktorantkę wyników do obecnego stanu wiedzy. Poprowadzona jest w sposób konsekwentny i spójny. Poza omówieniem wyników własnych na tle danych literaturowych, aplikantka przedstawia liczne informacje uzupełniające, co znacznie wzbogaca dyskusję i razem, ze wstępem stanowi kompendium podstawowej wiedzy w tym temacie. Mgr Rożej-Bielecka wykazuje w niej umiejętność prowadzenia dojrzałej dysputy naukowej i wyszukiwania danych literaturowych. W rozdziale tym brakuje mi jednak szerszego opisanie możliwości i klarownego wyjaśnienia podstaw i mechanizmu zastosowania analizy krzywych topnienia w celach diagnostycznych. Doktorantka nie wspomina czy istnieją już podobne testy diagnostyki różnicowej dla innych patogenów? Czy istnieją czynniki mogące zaburzyć wyniki i dać nieprawidłowe bądź niejednoznaczne rezultaty?

Szkoda, że w dyskusji lub wstępie zabrakło informacji dotyczącej przechodzenia babeszjozy z fazy chronicznej do fazy ostrej. Wydaje mi się, że taka wiedza wzbogaciłaby i urozmaiciła dyskusję. Szczególnie, że doktorantka omawia możliwość zaostrzania i zaburzania, przez *Babesia*, stanu pacjentów cierpiących na inne jednostki chorobowe.

Ciekawym spostrzeżeniem, szczególnie dla właścicieli psów, jest babeszjoza występująca poza sezonem „typowym” dla tego schorzenia, mianowicie w okresie przedwiośnia. Zwrócenie uwagi lekarzy weterynarii na ten fakt może mieć znaczenie dla praktyki weterynaryjnej. Podobnie, sporadyczne zaobserwowanie objawów uważanych za typowe w babeszjozie, może mieć zastosowanie w praktyce weterynaryjnej, pod warunkiem, że informacje te zostaną szerzej zaprezentowane. Równie ciekawe jest wnioskowanie doktorantki dotyczące korelacji między niską skutecznością szczepionek, a występowaniem inwazji mieszanych u psów.

Podsumowujące wyniki „Wnioski” zostały zbudowane na uzyskanych rezultatach. Wszystkie uważam za równie cenne i w pełni się z nimi zgadzam. Test opracowany przez doktorantkę może mieć istotne znaczenie dla poprawy diagnostyki różnicowej. Pozwala on na różnicowanie gatunków *Babesia* bez konieczności sekwencjonowania (podstawa do złożonego wniosku patentowego), w związku, z czym można łatwiej przypisać konkretne objawy do gatunku pierwotniaka. Jest to niewątpliwie znaczące osiągnięcie i duży sukces doktorantki.

Doktorantka słusznie podkreśla konieczność wprowadzenia badań w kierunku babeszjozy u krwiodawców, szczególnie z grupy ryzyka. Wcześniej należałoby jednak przeprowadzić szersze badania uwzględniające inne profesje, których wykonywanie może być związane ze zwiększonym ryzykiem występowania babeszjozy (myśliwi, leśnicy, pracownicy leśni, skauci, ludność wiejska *etc.*). Wówczas dałoby to pełniejszy obraz i mogłoby dostarczyć wielu ciekawych informacji, istotnych dla krwiodawstwa i krwiolecznictwa.

W „Piśmiennictwie” doktorantka nie stosuje się do powszechnie stosowanej zasady używania kursywy w pisowni nazw gatunkowych podawanych w języku łacińskim. Aplikantka powinna o tym pamiętać niezależnie od tego, czy wyniki rozprawy będą prezentowane w czasopiśmie krajowym, czy też zagranicznym. Jest ona również niekonsekwentna w podawaniu paginacji cytowanych artykułów, raz stosuje paginację pełną, innym razem skrótową (dla przykładu patrz pozycja 93 i 95 piśmiennictwa).


Ponieważ przepisy ustawy o języku polskim dotyczące ochrony tego języka nie mają zastosowania do twórczości naukowej i artystycznej, nie podejmuję się oceny poprawności stylu oraz stosowania zasad ortografii i interpunkcji.

Po zapoznaniu się z treścią przedstawionej mi do oceny pracy, mogę stwierdzić, że rozprawa napisana jest w sposób dojrzały. Doktorantka dobrze sprecyzowała cele badawcze, które zrealizowała. Poszczególne etapy pracy są dobrze opisane i szczegółowo przedstawione, zastosowana metodyka i przeprowadzone eksperymenty są prawidłowo dobrane i zrealizowane, a wnioski końcowe wynikają z uzyskanych wyników badań i są jednoznaczne. Rozprawa napisana jest zrozumiałym językiem, a wiodący udział doktorantki w przeprowadzonych analizach oraz interpretacji wyników nie budzi moich wątpliwości i świadczy o jej dojrzałości naukowej. W związku

z powyższym zamieszczone przeze mnie w recenzji uwagi i komentarze mają charakter konstruktywnej krytyki i nie obniżają mojej wysokiej oceny pracy.

Reasumując, przedstawiona mi do oceny rozprawa mgr Wioletty Rożej-Bielickiej pt. „Ocena rozpowszechnienia pierwotniaków z rodzaju *Babesia* w wybranych regionach Polski przy zastosowaniu technik molekularnych” jest dowodem umiejętności samodzielnego prowadzenia badań. Rozprawa ta spełnia warunki stawiane pracom doktorskim określone w ustawie o stopniach i tytule naukowym. Wnioskuje, zatem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Wioletty Rożej-Bielickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i publicznej obrony rozprawy.

Złożoność rozwiązywanego zagadnienia, oryginalność podejścia – szczególnie opracowanie nowej metody pozwalającej na różnicowanie gatunków *Babesia* bez konieczności sekwencjonowania - a także zakres pracy oraz wnikliwość Doktorantki zasługują na wyróżnienie, w związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – PZH, o rozważenie wyróżnienia rozprawy doktorskiej mgr Wioletty Rożej-Bielickiej.

ADIUNKT
Katedra Biologii Ogólnej i Parazytologii

dr hab. Daniel Młocicki prof. IPPAN