

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, 02.03.2022

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Moniki Rudzińskiej

pod tytułem „Badania nad występowaniem i zróżnicowaniem genotypowym *Blastocystis* izolowanych od ludzi i wybranych grup zwierząt w województwie pomorskim”.

Blastocystis hominis jest jednokomórkowym, pasożytniczym pierwotniakiem, szeroko rozpowszechnionym w przyrodzie. Występuje zarówno u ludzi jak i u zwierząt. Prewalencję *Blastocystis* ocenia się na poziomie od 5% do 50% w krajach rozwiniętych, do 100% w krajach rozwijających się. W ostatnich latach rośnie zainteresowanie tym pasożytem naukowców na całym świecie. Ze względu na zróżnicowaną wielkość i przyjmowanie różnych postaci morfologicznych, *Blastocystis* sprawia duże trudności diagnostyczne. Pasożyt ten charakteryzuje się wysoką różnorodnością genetyczną, do tej pory opisano 28 podtypów oznaczonych numerami od ST1 do ST32 (z wyłączeniem podtypów poddanych w wątpliwość). Kliniczne cechy choroby wywoływanej przez *Blastocystis* spp. są niespecyficzne i mogą obejmować objawy zarówno ze strony układu pokarmowego jak i manifestacje skórne. Od wielu lat naukowcy poszukują jednoznacznych dowodów na enteropatogeny charakter pasożyta. W Polsce brakuje pogłębionych opracowań dotyczących prewalencji, dróg transmisji a także różnorodności genetycznej *Blastocystis* u ludzi i zwierząt. Dlatego też podjęcie przez Doktorantkę badań nad występowaniem i zróżnicowaniem genotypowym tego pierwotniaka należy uznać za celowe i istotne w rozwoju naszej wiedzy.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi spójny tematycznie cykl pięciu artykułów opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych w latach 2013–2021. Prace zostały przedstawione i syntetycznie scharakteryzowane w Rozdziale 4 rozprawy.

Łączna wartość współczynnika wpływu („impact factor”) wynosi 11.344 a liczba przypisanych im punktów zgodnie z wykazem czasopism MNiSW wynosi 323.

Należy szczególnie podkreślić, że w czterech z tych prac Doktorantka jest pierwszym autorem. Z oświadczeń podpisanych przez współautorów wynika, że w powstaniu każdej z tych prac Doktorantka odegrała kluczową rolę poprzez: opracowanie koncepcji, wykonanie części eksperymentalnej oraz opracowanie i interpretację wyników.

Opracowanie zawierające ww. cykl publikacji liczy 152 strony. Składa się z 10. rozdziałów głównych, obejmujących: wprowadzenie, cel pracy, materiały i metody, omówienie prac będących przedmiotem rozprawy doktorskiej, kopii tych prac oraz oświadczeń współautorów odnośnie wkładu w powstanie publikacji, podsumowanie i wnioski, załącznik manuskryptu w przygotowaniu,

streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz piśmiennictwa. Układ pracy jest logiczny, kolejność rozdziałów poprawna i typowa dla opracowań naukowych.

Głównym celem rozprawy było poszerzenie wiedzy na temat epidemiologii *Blastocystis* poprzez zbadanie występowania i zróżnicowania genetycznego *Blastocystis* izolowanych od ludzi i wybranych grup zwierząt. Doktorantka realizowała cel główny poprzez cele szczegółowe, w których założyła zbadanie prevalencji *Blastocystis* wśród pacjentów Przychodni Chorób Zakaźnych, Tropikalnych i Pasożytniczych (PCHZTP) a także zbadanie czy podróże do strefy klimatu gorącego wpływają na zarażenie tymi pierwotniakami. Autorka podjęła się również zbadania występowania *Blastocystis* u różnych grup zwierząt a także zajęła się określeniem transmisji tych pasożytów pomiędzy ludźmi i zwierzętami będącymi w kontakcie.

We WPROWADZENIU Doktorantka, w sposób zwięzły, w oparciu o dobrze dobrane piśmiennictwo, omówiła historię i taksonomię, biologię, diagnostykę oraz ogólną epidemiologię *Blastocystis*.

Ważną częścią pracy jest rozdział MATERIAŁY I METODY, w którym Doktorantka opisuje przygotowanie materiału do badań (próbki kału pochodzące od badanych pacjentów oraz wybranych grup zwierząt) i używane techniki.

Autorka wraz z zespołem, wykorzystwała zarówno konwencjonalne jak i nowoczesne metody badawcze, w pełni porównywalne do stosowanych w ośrodkach zagranicznych. Na podkreślenie zasługuje zastosowanie techniki STS-PCR (Sequence-Tagged Site PCR), pozwalającej na wykrycie poszczególnych podtypów oraz techniki „DNA barcoding”, polegającej na uzyskaniu sekwencji fragmentu genu i porównywaniu go ze znanymi sekwencjami, co ma duże znaczenie w przypadku badania organizmu o tak wysokiej różnorodności genetycznej. Wybrane sekwencje zidentyfikowane w badaniach, zdeponowano w bazie danych GenBank. Wykonano również analizę filogenetyczną uzyskanych sekwencji. Przeprowadzone badania były bardzo pracochłonne i wymagały wysokiej precyzji. Analiza statystyczna została zaplanowana i przeprowadzona poprawnie.

W kolejnym rozdziale, Doktorantka przedstawiła poszczególne publikacje, będące podstawą rozprawy doktorskiej. Wszystkie 5 prac w bardzo spójny sposób dotyczy zagadnień związanych występowaniem *Blastocystis* u ludzi i zwierząt.

Pierwsza praca cyklu zatytułowana „Diagnostyka laboratoryjna zarażeń *Blastocystis* – wyzwania i kontrowersje”, 2020, opublikowana w czasopiśmie „Diagnostyka laboratoryjna” ma charakter pracy poglądowej, w oparciu o dobrze dobrane piśmiennictwo omawia taksonomię, diagnostykę, kontrowersje kliniczne oraz epidemiologię *Blastocystis*. Praca nie została przez Autorkę omówiona w ramach cyklu. Kolejne prace mają charakter prac oryginalnych.

Drugi artykuł cyklu „Ocena częstości zarażeń pasożytami jelitowymi wśród pacjentów przychodni Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdyni w okresie ostatnich 30 lat”, 2013, opublikowany został również w czasopiśmie „Diagnostyka laboratoryjna”. Celem tej pracy była ocena częstości występowania pasożytów jelitowych w badanej populacji w latach 1978-2010. Podczas analizy wyników badań koproskopowych pacjentów Wojewódzkiej Przychodni Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych IMMiT, Doktorantka zaobserwowała tendencję wzrostową wykrywania *Blastocystis* na przestrzeni 18 lat, z poziomu 1,34% w 1992 roku do 18,8% w 2010 roku. W przedstawionej pracy analiza zarażeń pasożytami jelitowymi była prowadzona od 1978 roku, ale *Blastocystis*

ewidencjonowany był dopiero od 1992 roku. Wyniki tej pracy zainspirowały Autorkę do bliższego zainteresowania się *Blastocystis*, który w tamtym czasie był mało poznanym pasożytem, a efektem tych zainteresowań były pogłębione badania nad tym pierwotniakiem. Na uznanie zasługuje bardzo wysoka liczba (52118) wyników pacjentów poddanych niniejszej analizie. Mimo, że przeprowadzone badania opierały się tylko na diagnostyce mikroskopowej, to dzięki tak obszernym studiom wniosły cenne informacje o nowym zagrożeniu zdrowia publicznego.

W trzecim artykule z cyklu „*Blastocystis* subtypes isolated from travelers and non-travelers from the north of Poland - A single center study”, 2019, opublikowanym w czasopiśmie *Infection, Genetics and Evolution*, Doktorantka poddała w rozważanie możliwość nabywania przez ludzi *Blastocystis* podczas podróży do krajów strefy klimatu gorącego. W literaturze wykazano, że występowanie niektórych podtypów może być związane z rozmieszczeniem geograficznym pasożyta. Za szczególnie ważne osiągnięcie badania uważam wykrycie pięciu subtypów *Blastocystis* w badanej populacji ludzi (ST1, ST2, ST3, ST6 i ST7). W prowadzonych obserwacjach Doktorantka zwróciła uwagę, że podróże do krajów tropikalnych mogą sprzyjać zarażeniom niektórymi podtypami (w tym przypadku ST1 i ST2), co jest istotną informacją zarówno z punktu widzenia klinicznego jak i epidemiologicznego. Wyniki badania wnoszą również ważne informacje w aspekcie medycyny podróży, zwłaszcza w dobie dynamicznie rozwijającej się turystyki.

Ważnym aspektem rozprawy jest podjęcie przez Doktorantkę problemu transmisji *Blastocystis*, któremu przypisuje się zoonotyczny charakter. W dwóch kolejnych pracach: “First Report on the Occurrence and Subtypes of *Blastocystis* in Pigs in Poland Using Sequence-Tagged-Site PCR and Barcode Region Sequencing”, 2020, opublikowanej w czasopiśmie “*Pathogens*” oraz “Molecular Characterization of *Blastocystis* from Animals and Their Caregivers at the Gdańsk Zoo (Poland) and the Assessment of Zoonotic Transmission”, 2021, opublikowanej w czasopiśmie “*Biology*”, Doktorantka wykazała nowe podtypy *Blastocystis* dla fauny Polski oraz zwierząt hodowanych w ogrodzie zoologicznym a także potwierdziła, że zwierzęta stanowią potencjalny rezerwuuar *Blastocystis* dla człowieka. Ustalenie genotypów pasożyta jest istotne ze względu na skutki kliniczne, uzasadnienie konieczności leczenia a także wyznaczenie standardów profilaktycznych.

Na podkreślenie zasługuje opisanie po raz pierwszy w Polsce obecności trzech podtypów *Blastocystis* (ST1, ST3, ST5) u trzody chlewnej. Doktorantka potwierdziła, że świnie są prawdopodobnie naturalnym żywicielem ST5, a obecność zoonotycznych podtypów wskazuje, że trzoda chlewna może być rezerwuarem *Blastocystis*. W swoich obserwacjach dotyczących zwierząt z ogrodu zoologicznego Doktorantka stwierdziła osiem podtypów *Blastocystis* i wskazała na niską specyficzność żywicielską podtypów ST1 i ST3 a wyższą w przypadku ST5, ST8, ST10 oraz ST14. Autorka zwróciła uwagę, że znajomość podtypów pierwotniaka u zwierząt, jest ściśle związana z aspektem epidemiologicznym.

W badaniu nad występowaniem *Blastocystis* u zwierząt z ogrodu zoologicznego i ich opiekunów, stwierdzono obecność pierwotniaka u 26, 86% zwierząt i 17,14% ich opiekunów. Cenną obserwacją było wykazanie identycznych sekwencji ST1 u małą i ich opiekuna, co potwierdza możliwość transmisji, chociaż nie można z całą pewnością potwierdzić w jakim kierunku. Wykazanie obecności *Blastocystis* u świń i zwierząt z ogrodu zoologicznego wnosi cenny wkład w poszerzenie wiedzy na temat występowania tego pierwotniaka w środowisku oraz rezerwuuarowej roli zwierząt. Na szczególną pochwałę zasługuje dobór metod badawczych i opanowanie przez Doktorantkę szeregu technik diagnostycznych.

Oprócz zagadnień badawczych podjętych w opublikowanych pracach, Doktorantka zwróciła uwagę na potencjał zoonotyczny tak zwanych „pet animals” i załączyła do cyklu wyniki badań nad występowaniem *Blastocystis* u zwierząt towarzyszących i ich właścicieli. Ze względu na wzrost zainteresowania w Polsce hodowlą zwierząt w warunkach domowych, Autorka podkreśla rolę zwierząt towarzyszących jako potencjalnego rezerwuaru *Blastocystis*. W wyniku przeprowadzonych badań nie stwierdzono obecności tego pierwotniaka u psów i kotów. Obserwacje są zgodne z danymi z piśmiennictwa co wskazuje na spójność danych. Należy podkreślić obszerność zaplanowanego badania oraz wnikliwą analizę piśmiennictwa dotyczącą występowania i zróżnicowania genetycznego *Blastocystis* u psów w różnych krajach na świecie. Na uwagę zasługuje wykazanie po raz pierwszy *Blastocystis* u agam brodatych i gekona lamparciego. Zidentyfikowane u tych gadów genotypy *Blastocystis* są różne od stwierdzanych u ludzi, co jest to cenną informacją w aspekcie epidemiologicznym, gdyż nie powinno dochodzić do zarażenia nimi ludzi.

Rozdział PODSUMOWANIE I WNIOSKI jest syntetycznym zebraniem głównych osiągnięć cyklu. Biorąc pod uwagę zakres podjętych badań warto podkreślić, iż wnioski są ujęte trafnie, syntetycznie i odpowiadają na założone cele. Stwierdzenie nowych podtypów u badanych zwierząt wnosi cenny wkład w poszerzenie wiedzy o występowaniu *Blastocystis*. Na szczególną uwagę zasługują wnioski dotyczące dróg transmisji *Blastocystis* w aspekcie zdrowia publicznego i podjęcia odpowiedniej profilaktyki ze względu na zoonotyczny charakter pierwotniaka.

Doktorantka w swoich badaniach podkreśliła również potrzebę ujednoczonego schematu postępowania w diagnostyce *Blastocystis*. Metody mikroskopowe są niewystarczające, a metody STS-PCR i barcodingu stosowane osobno nie pozwoliły na wykrycie wszystkich przypadków zarażenia. Autorka wskazała, że należy poszukać takich metod identyfikacji *Blastocystis*, które umożliwią wykrywanie wszystkich przypadków zarażeń *Blastocystis*, także infekcji mieszanych.

Pracę zamyka przegląd piśmiennictwa. Dobór literatury jest właściwy i odzwierciedla stan wiedzy dotyczący podjętej problematyki.

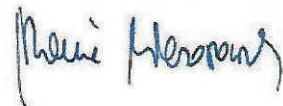
Z obowiązku recenzenta chcę zwrócić uwagę na kilka faktów. Na stronie 22 Wprowadzenia sugerowałabym uzupełnić informacje o subtypy ST30, ST31 oraz ST32. Moim zdaniem, we Wprowadzeniu, warto byłoby przedstawić sytuację epidemiologiczną *Blastocystis* w Polsce, co wyeksponowałoby ważne osiągnięcia opublikowane w pracach wchodzących w skład cyklu. Zacytowana rycina 5 oraz Tabela 2 są cenną informacją w kontekście epidemiologicznym, ale wskazane byłoby skomentowanie przez Autorkę tych źródeł informacji, aby ułatwić czytelnikowi orientację w zagadnieniu. W rozdziale 4, sprecyzowanie celu drugiej pracy z cyklu nieco odbiega od celów zapisanych w manuskrypcie, gdyż według autorów pracy jest to szeroko zakrojona „ocena częstości zarażenia pasożytami jelitowymi...”, a nie „...ocena częstości zarażenia *Blastocystis*...”. Powyższe uwagi w niczym nie umniejszają wartości merytorycznej ocenianej pracy doktorskiej a wymagają jedynie doprecyzowania informacji.

PODSUMOWANIE

Oceniam wysoko wartość merytoryczną pracy doktorskiej pani mgr inż. Moniki Rudzińskiej. Dowodzi ona umiejętności prowadzenia przez Doktorantkę pracy naukowej, zarówno w sferze zaprojektowania eksperymentu naukowego jak i posługiwania się nowoczesnymi metodami badawczymi, umiejętnością analizy uzyskanych wyników i wyciągania odpowiednich wniosków.

W świetle powyższych danych stwierdzam, że recenzowana rozprawa mgr inż. Moniki Rudzińskiej spełnia warunki określone w art. 190 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668) i dlatego przedkładam wniosek do Rady Nauk o Zdrowiu Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr inż. Moniki Rudzińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie ze względu na wysoką wartość osiągnięcia, szeroki zakres przeprowadzonych badań oraz wyniki istotne w rozwoju dyscypliny, przedkładam wniosek o wyróżnienie rozprawy.



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