

Prof. dr hab. Krzysztof Tomczuk
Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin 07.01.2021

RECENZJA

dysertacji doktorskiej Pana lek. wet. Macieja Kochanowskiego
pt. „*Walidacja i ocena wartości diagnostycznej metod immunoenzymatycznych do*
*wykrywania antygenów *Anisakis simplex* w produktach rybnych*”
wykonanej pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Tomasza Cenceka
oraz : dr Mirosława Różyckiego w Zakładzie Parazytologii
Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowy Instytut Badawczy
w Puławach

Promocja większego udziału produktów rybnych w diecie człowieka jako element strategii „zdrowego” odżywiania powoduje w ostatnich latach zwiększone spożycie ryb i ich przetworów. Fakt ten wywołuje jednocześnie falę dyskusji o innych często negatywnych aspektach zdrowotnych takiej tendencji. Analizowane są najczęściej negatywne aspekty bakteriologiczne oraz toksykologiczne związane z pozostałościami antybiotyków lub metali ciężkich. Stosunkowo niewiele uwagi poświęca się zagrożeniom inwazjologicznym i ich konsekwencjom. Parazytozy ryb są niedocenianym wielopłaszczyznowym problemem zarówno ekonomicznym jak i zdrowotnym. Nieliczne z nich wykazując cechy zoonotyczne zaliczane są do grupy pasożytów człowieka przenoszonych przez żywność -foodborne parasites. Przykładem takiej parazytozy jest inwazja larwalna glist z rodziny Anisakidae. Jako niczenie jelitowe ssaków wodnych przechodzą złożony cykl rozwojowy z udziałem żywicieli pośrednich – bezkręgowców (skorupiaki planktonowe) oraz wielu różnych żywicieli paratenicznych – kręgowców wodnych; w tym ryb planktonożernych, drapieżnych oraz człowieka. Żywiciele parateniczni mogą się kaskadowo zarażać zjadając inwazyjne larwy obecne w innych zwierzętach stanowiących ich pokarm.

Inwazja u człowieka występuje wyłącznie w postaci larwalnej i dotyczy ściany żołądka, jelit oraz jamy otrzewnowej. Choroba wywołana obecnością aktywnych pasożytów jest inwazją larwalną - anisakioza (łac. anisakosis). Odrębnym problemem związanym pośrednio z pasożytami z rodziny Anisakidae jest możliwość wystąpienia anafilaksji pokarmowej wywołanej alergenami związanymi z tymi nicieniami. Alergeny te są białkami termostabilnymi pochodzenia somatycznego oraz wydaliniczo-wydzielniczego. Nie ulegają destrukcji pod wpływem procesów technologicznych przez co mogą być obecne w przetworzonej żywności. Zagrożenie to dotyczy wyłącznie u osób wrażliwych podobnie jak w wielu innych anafilaksjach. W potocznym języku określane jest często jako „zatrucie śledziowe”. Z punktu widzenia patogenyzy tej choroby, jest to forma alergii i nie może być rozpatrywana jako parazytoza. Jedynym skutecznym sposobem zapobiegania tej chorobie jest unikanie spożywania produktów rybnych mogących zawierać alergeny związane z nicieniami z rodziny Anisakidae. Dotychczas brak jest skutecznych metod diagnostycznych mogących znaleźć zastosowanie w szybkim wykrywaniu alergenów w produktach rybnych. Brak jest także rozwiązań legislacyjnych regulujących obrót żywnością zawierającą te alergeny. Dlatego prace naukowe przyczyniające się do nagłośnienia problemu „zatruc rybam” zmierzające do wypracowania nowych metod diagnostycznych są szczególnie cenne. Wybór tematyki badawczej oceniam bardzo wysoko zarówno z naukowego jak i aplikacyjnego punktu widzenia.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma formę jednotematycznego zbioru opublikowanych w renomowanych czasopismach oryginalnych artykułów naukowych. W ramach recenzowanej pracy ujęto pięć artykułów opublikowanych w latach 2018-2020:

1. M. Kochanowski, M. Różycki, J. Dąbrowska, E. Biliska-Zajac, J. Karamon, E. Antolak, K. Grądział-Krukowska, T. Cencek: Metody wykrywania *Anisakis simplex* w rybach i produktach rybnych. *Medycyna Weterynaryjna*, 2018, 74, 247-252.

FI2018 = 0,26; MNiSW2018 = 20

2. M. Kochanowski, M. González-Muñoz, M. Á. Gómez-Morales, B. Gottstein, J. Dąbrowska, M. Różycki, T. Cencek, N. Müller, G. Boubaker: Comparative analysis of excretory-secretory antigens of *Anisakis simplex*, *Pseudoterranova decipiens* and *Contracaecum osculatum* regarding their applicability for specific serodiagnosis of

human anisakidosis based on IgG-ELISA. *Experimental Parasitology*, 2019, 197, 9-15.

IF2019 = 1,690; MNiSW2019 = 100

3. M. Kochanowski, J. Dąbrowska, M. Różycki, J. Karamon, J. Sroka, T. Cencek: Proteomic profiling reveals new insights into the allergomes of *Anisakis simplex*, *Pseudoterranova decipiens* and *Contracaecum osculatum*. *Journal of Parasitology*, 2020, 106, 572-588.

IF2020 = 1,109; MNiSW2020 = 70

4. M. Kochanowski, M. Różycki, J. Dąbrowska, A. Bełcik, J. Karamon, J. Sroka, T. Cencek: Proteomic and bioinformatic investigations of heat-treated *Anisakis simplex* third-stage larvae. *Biomolecules*, 2020, 10, 1066.

IF2020 = 4,082; MNiSW2020 = 100

5. M. Kochanowski, M. Różycki, J. Dąbrowska, J. Karamon, J. Sroka, E. Antolak, A. Bełcik, T. Cencek: Development and application of novel chemiluminescence immunoassays for highly sensitive detection of *Anisakis simplex* proteins in thermally processed seafood. *Pathogens*, 2020, 9, 777.

IF2020 = 3,018; MNiSW2020 = 100.

Włączone do cyklu publikacyjnego prace są opracowaniami wieloautorskimi w których doktorant jest pierwszym autorem. Wszystkie zostały opublikowane w renomowanych czasopismach z listy *Journal Citation Report* (JCR). Sumaryczny czynnik wpływu (IF) wynosi 10,159 a łączna liczba punktów dla czasopism z bazy MNiSW, wynosi 390. Spośród załączonych prac jedna jest artykułem przeglądowym (1) a cztery pozostałe są pracami doświadczalnymi zawierającymi wyniki badań własnych. Spełniając wymóg jednotematyczności cyklu, wszystkie prace poświęcone są problematyce związanej z próbami zastosowania diagnostyki serologicznej do wykrywania antygenów nicieni z rodziny Anisakidae. Dobór publikacji w ramach tematyki cyklu jest bardzo trafny i wyczerpuje wszystkie postawione w dysertacji doktorskiej cele. Koncepcja pracy doktorskiej jest doskonale przemyślana obejmując aspekty poznawcze jak i ich możliwe zastosowanie praktyczne w postaci nowych rozwiązań diagnostycznych. Naukowy oraz aplikacyjny charakter pracy czyni z niej wyjątkowo cenne osiągnięcie.

Dysertacja doktorska liczy 75 stron maszynopisu oraz kopie opublikowanych prac. Poza stroną tytułową zawiera podziękowania (1 str.), spis treści (1 str.), wykaz artykułów naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej (1 str.), wykaz skrótów (2 str.),

streszczenie w języku polskim (4 str.), streszczenie w języku angielskim (3 str.), obszerny wstęp będący uzasadnieniem podjętych badań (29 str.), przedstawienie celów badań związanych z pracą doktorską (1str.), rozdział dotyczący omówienia wyników wraz a analizą literatury naukowej (20 str.), sformułowane wnioski (1str.), oświadczenia promotora oraz autora pracy doktorskiej (1str.), informację dotyczącą finansowania badań (1str.) i bogate piśmiennictwo (10 str.).

We wstępie, w podrozdziale „Ogólna charakterystyka *Ansakis simplex*” doktorant na przykładzie najczęściej stwierdzanego gatunku dokonał analizy taksonomicznej i morfologicznej pasożyta oraz opisał cykl rozwojowy z przytoczeniem występujących żywicieli.

Mam w tym miejscu wiele uwag szczególnie w aspekcie taksonomii. Autor przytacza niewłaściwy układ taksonów wykazując klasę i podklasę które występują jedynie w systematyce roślin. Pomija typ któremu nadaje rangę gromady. Niezrozumiałym dla mnie jest przypisanie nicieni z rodziny Anisakidae do rzędu Rabditida. Właściwym dla rodziny Anisakidae jest rząd Ascaridida. Nie wiadomo dlaczego autor lokalizuje te nicienie w taksonie – „podrząd Spirurina”. Spirurina należy do rzędu Spirurida, jest to zdecydowanie odrębna grupa nicieni, najczęściej lokalizujących się w tkankach. Autor nie cytuje pozycji piśmiennictwa z której zaczerpnął tę systematykę. Wg mojej wiedzy właściwa byłaby następująca systematyka: Królestwo: Animalia. Typ: Nematoda. Gromada: Secernentea, (Phasmidia). Rząd: Ascaridida. Rodzina: Anisakidae.

Podobne nieścisłości znajdują również w części dotyczącej morfologii larw L3 *Anisakis simplex*. Autor opisuje u tych nicieni „gruczoły boczne” –prawdopodobnie chodzi o gruczoły naboczne- amfidia, które występują tylko w obrębie gromady Adenophorea. Różnice dotyczące występowania tych gruczołów są podstawą przyjętej systematyki i warunkują przynależność do odrębnych gromad. Nicienie należące do gromady Secernentea (Phasmidia) posiadają phasmidia (gruczoły przygonowe) zawierające chemoreceptory, natomiast amfidia (narządy naboczne) u nicieni w obrębie tej gromady nie występują.

W kolejnych podrozdziałach wstępu doktorant analizuje oddziaływanie chorobotwórcze nicieni z rodziny Anisakidae. Różnicuje tu przebieg typowej parazytozy z człowiekiem jako żywicielem paratenicznym – anisakioza, od stanu nadwrażliwości niektórych ludzi na alergeny tych nicieni. Mimo to w niektórych fragmentach tekstu autor niezbyt czytelnie różnicuje tę parazytozę od anafilaksji pokarmowej, szczególnie w kontekście prewalencji tych chorób. Analiza bogatego piśmiennictwa pozwoliła

zobrazować prewalencję obu zagrożeń i wykazać ich częste występowanie w populacji ludzi preferujących zwiększony udział ryb i produktów rybnych w diecie. Wykazała jednocześnie brak skutecznych i wiarygodnych rozwiązań diagnostycznych w wykrywaniu zagrożenia w postaci obecności alergenów w przetworzonych produktach pochodzenia rybnego.

W ostatniej części wstępu autor koncentruje się wyłącznie na analizie dotychczasowej wiedzy dotyczącej alergenów *Anisakis simplex*. Wskazuje na wiele niewiadomych w zakresie ich właściwości i funkcji oraz stawia tezę, iż nie wszystkie aktywne białka zostały dotychczas poznane. Przedstawione rozważania ujęte we „Wstępie” ocenianej pracy stanowią gruntowne teoretyczne uzasadnienie badań będących przedmiotem dysertacji doktorskiej.

Rozprawa doktorska ma charakter wielowątkowy oscylując wokół różnych aspektów immunologicznych związanych z antygenami nicieni z Rodziny Anisakidae. Nadrzędnym celem badań było natomiast opracowanie i wdrożenie metody immunoenzymatycznej do wykrywania antygenów larw L3 *A. simplex* w przetworzonych produktach rybnych.

Założone cele doktorant zrealizował etapowo w czterech zadaniach. Poszczególne zadania były realizowane w ramach prac opisywanych w kolejnych publikacjach.

Pierwsza z nich o charakterze przeglądowym zatytułowana „Metody wykrywania *Anisakis simplex* w rybach i produktach rybnych” dokonuje analizy dostępnej wiedzy dotyczącej metod wykrywania larw L3 *A. simplex* w rybach i produktach rybnych. Autor analizuje możliwe metody bezpośrednie w tym obrazowe, immunologiczne oraz genetyczne wraz z ich zaletami i ograniczeniami. Wykazuje jednocześnie, że aktualnie brak jest komercyjnych testów immunoenzymatycznych umożliwiających szybkie wykrywanie białek *A. simplex* w produktach rybnych. Stwierdzenie to stało się wyzwaniem dla autora do opracowania takiego testu.

Jako zadanie drugie doktorant postanowił dokonać gruntownej analizy antygenów nicieni z rodziny Anisakidae. To bardzo pracochłonne wyzwanie autor zrealizował w ramach trzech pracach doświadczalnych. W pierwszej z nich w ramach współpracy Instytutem Parazytologii w Bernie dokonał porównania skuteczności antygenów nicieni z rodziny Anisakidae do serologicznej diagnostyki anisakiozy u ludzi. Wykazał najwyższą czułość testu IgG ELISA sięgającą 100 % przy użyciu antygenów wydaliniczo-wydzielniczych (ES) gatunku *Contracaecum osculatum* a także mieszaniny antygenów ES trzech gatunków (*Pseudoterranova decipiens*, *A. simplex*, *C. osculatum*). Z uwagi na jednocześnie wysoką specyficzność reakcji, antygen ES *C. osculatum* okazał się być najbardziej przydatnym w diagnostyce serologicznej anisakiozy u ludzi.

Doktorant w ramach tego samego zadania dokonał charakterystyki profilu proteomicznego antygenów nicieni z rodzaju Anisakidae. Przeprowadził porównawczą analizę antygenów somatycznych larw L3 *A. simplex*, *P. decipiens* oraz *C. osculatum* metodą technik łączonych spektrometrii mas LC-MS/MS z użyciem spektrometru mas wysokiej rozdzielczości Q-Exactive. Szczególnie ta część badań wniosła wiele nowych danych do ogólnej wiedzy dotyczącej różnorodności antygenowej i alergogennej nicieni z rodziny Anisakidae. Uzyskane wyniki są niezwykle ciekawe i mogą być przydatne przy poszukiwaniu nowych rozwiązań diagnostycznych i terapeutycznych.

W celu wykazania realnego zagrożenia w postaci obecności alergenów *A. simplex* w żywności po obróbce termicznej doktorant dokonał analizy proteomicznej i bioinformatycznej peptydów jako potencjalnych alergenów w próbach zawierających antygeny *A. simplex* poddanych autoklawowaniu. Analizując pełne antygeny tego gatunku nicienia po obróbce cieplnej techniką LC-MS/MS, po analizie bioinformatycznej, po porównaniu profili SDS-PAGE oraz porównaniu techniką Western Blot potwierdzono obecność potencjalnych alergenów homologicznych do substancji stwierdzanych w próbach nie poddawanych reakcji termicznej. Wskazuje to jednoznacznie, iż przetworzone produkty rybne mogą stanowić potencjalne zagrożenie dla uczulonych konsumentów.

Kolejnym zadaniem było opracowanie i walidacja immunoezymatycznej metody wykrywania antygenów *A. simplex* w przetworzonych produktach rybnych. Wagę tego zadania potwierdza fakt braku na rynku komercyjnych testów ELISA służących temu celowi. W ramach tego zadania opracowano dwa chemiluminescencyjne testy– CL-S-ELISA oraz CL-C-ELISA cechujące się wysoką czułością i specyficznością. Specyficzność testów określono oceniając reakcje krzyżowe z próbkami tkanki mięśniowej różnych gatunków ryb oraz dodatków spożywczych pochodzenia roślinnego. Czułość testów kontrolowano komercyjnym testem real-time PCR do wykrywania DNA *A. simplex*. Z dwu opracowanych testów bardziej przydatny okazał się test CL-S-ELISA który znalazł zastosowanie w badaniach usługowych, jak i naukowych.

Trzecim zadaniem realizowanym przez doktoranta było sprawdzenie w praktyce opracowanego testu a jednocześnie określenie skali występowania antygenów *A. simplex* w produktach rybnych dostępnych w Polsce w aspekcie zagrożenia zdrowia wrażliwych konsumentów. Materiałem do badań były dostępne w handlu produkty rybne o różnym stopniu przetworzenia. Antygen *A. simplex* stwierdzono w 28% badanych produktów. Jest to wynik który może wprawić w zaniepokojenie służby sanitarne. Biorąc pod uwagę brak obecnie uregulowań prawnych dotyczących obecności alergenów w żywności, wyniki tych badań

powinny być sygnałem do podjęcia wielopłaszczyznowych działań dotyczących uregulowania tego problemu.

Wyniki badań pozwoliły na wysunięcie 7 wniosków korespondujących do przyjętych celów badań. Sprowadzają się one do stwierdzenia, że w proteomach różnych gatunków nicieni z rodziny Anisakidae obecnych w rybach i ich przetworach występuje wiele wspólnych potencjalnych alergenów które w warunkach autoklawowania nie ulegają degradacji. Jednocześnie wykazano wysoką przydatność opracowanego testu CL-S-ELISA którym wykazano znaczące zanieczyszczenie przetworzonych produktów rybnych alergenami o wysokim potencjalnym znaczeniu chorobotwórczym dla wybranej populacji ludzi.

Nie wnoszę żadnych uwag co do wartości merytorycznej pracy. Wręcz przeciwnie w tym aspekcie oceniam ją bardzo wysoko. Doktorant wykazał się dużą znajomością tematyki badań molekularnych i serologicznych które zaowocowały bardzo nowatorskimi wynikami i wnioskami. Wyjątkowo wysoko oceniam aspekt aplikacyjny badań które pozwolą w przyszłości na uregulowanie nierozwiązanego problemu dostępności żywności zanieczyszczonej alergenami. Również opracowanie edytorskie przedstawione jest w sposób czytelny i układa się w logiczną całość. Pragnę jednak zwrócić uwagę na nieścisłości językowe dostrzeżone w pracy. Zarówno w tekście dysertacji jak i analizowanych opublikowanych artykułach autor używa różnych określeń związanych z nazwami chorób pasożytniczych w tym anisakiozy. Pragnę nakreślić, iż zarówno „Leksykon parazytologiczny” 2016 r. jak i „Słownik parazytologiczny” z 1998 r. wydane przez Instytut Parazytologii PAN wskazują jednoznacznie ma zasadę tworzenia nazw chorób pasożytniczych. W tym kontekście określenia polskojęzyczne: anisakidoza, schistosomatoza jak i łacińskojęzyczne: anisakidosis, filariasis, strongyloidiasis, ascariasis, toxocariasis, amoebiasis, leishmaniasis odnalezione w analizowanych tekstach są niewłaściwe. Jednocześnie zdaję sobie sprawę z obecności takiego nazewnictwa w wielu dostępnych pracach naukowych, zwłaszcza klinicznych z anglojęzycznej strefy językowej gdzie nie przykładą się do tego wielkiej uwagi.

Powyższa uwaga jak i wcześniejsze dotyczące wstępu nie umniejszają wartości ocenianej dysertacji a szczególnie wartości poznawczych i aplikacyjnych wykonanych badań. Uważam jednak, iż nawet wyjątkowo wartościowe merytorycznie prace powinny być napisane poprawnym językiem naukowym a ich forma nie budzić wątpliwości.

Pracę doktorską Pana lek. wet. Macieja Kochanowskiego oceniam bardzo wysoko. Doktorant w pełni zrealizował postawione w założeniach pracy cele i sformułował ciekawe wnioski. W mojej opinii pozwolą one na wszczęcie działań zmierzających do opracowania procedur minimalizujących ryzyko występowania „zatruc rybam” u konsumentów. Wielkim

atutem badań obejmujących tematykę pracy doktorskiej jest ich globalny wymiar oraz wyjątkowo praktyczny charakter.

Przedstawiona do oceny praca jest wartościowym, oryginalnym i samodzielnym dorobkiem naukowym lek. wet. Macieja Kochanowskiego. Moim zdaniem odpowiada w pełni warunkom określonym w art. 13 Ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U. Nr 65, poz. 595), a także zapisom Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22 września 2011 roku w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz postępowaniu o nadanie tytułu profesora.

Z pełną odpowiedzialnością przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie lek. wet. Macieja Kochanowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wysoka ocena pracy szczególnie w aspekcie jej aplikacyjnego charakteru, upoważnia mnie do wystąpienia do Wysokiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach o wyróżnienie pracy doktorskiej lek. wet. Macieja Kochanowskiego stosowną nagrodą.

Lublin, dnia 07. 01. 2021 r.



prof. dr hab. Krzysztof Tomczuk