

Dr hab. n. med. Beata Szostakowska
Katedra Medycyny Tropikalnej i Parazytologii
Zakład Parazytologii Tropikalnej
Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk, 10.01.2021.

RECENZJA

osiągnięcia naukowego lek. wet. Macieja Kochanowskiego pt. „Walidacja i ocena wartości diagnostycznej metod immunoenzymatycznych do wykrywania antygenów *Anisakis simplex* w produktach rybnych”

Nicienie z rodziny Anisakidae są szeroko rozpowszechnione w środowisku wodnym, głównie w wodach morskich, całego globu. Postacie dorosłe są pasożytami zwierząt stałocieplnych: głównie ssaków morskich, a niektóre gatunki z rodzaju *Contracaecum* także ptaków rybożernych, natomiast larwy pasożytują u skorupiaków, ryb i głowonogów. Larwy *Anisakis simplex*, *Pseudoterranova decipiens* oraz *Contracaecum osculatum* mają potencjał zoonotyczny. Przypadkowe spożycie żywych larw wraz z mięsem zarażonych ryb czy głowonogów niepoddanym obróbce cieplnej może spowodować dolegliwości, zwykle żołądkowe lub jelitowe, a sporadycznie także inne. Dolegliwości te znane są pod nazwą „anisakidoza” i objawiają się niespecyficzenie, co może powodować, że są mylnie diagnozowane, przy czym inwazje te mogą przebiegać łącznie z objawami alergii. Możliwe jest także, że u człowieka występują jedynie objawy alergiczne. Pasożyty zabija zarówno odpowiednie podwyższenie temperatury jak i mrożenie, co zabezpiecza przed anisakidozą. Nie chroni to jednak przed reakcjami alergicznymi u uczulonych osób, gdyż część alergenów jest termostabilna, co oznacza, że u uczulonych osób, nawet spożycie wysoce przetworzonych ryb (jak np. konserwy) może wywołać odczyny alergiczne, niekiedy o nasilonym przebiegu włącznie ze wstrząsem anafilaktycznym. Alegria na antygeny Anisakidae w niektórych rejonach świata (np. Kraj Basków w północnej Hiszpanii) stanowi główny problem związany z alergiami pokarmowymi. Szacuje się, że obecnie przypadków anisakidozy na świecie może być ponad 70 tysięcy, z czego połowa to przypadki europejskie – głównie z Hiszpanii i Włoch.

Anisakidoza jest jednostką chorobową dobrze opisaną i coraz powszechniej braną pod uwagę w diagnostyce pacjentów z dolegliwościami żołądkowo-jelitowymi jeśli w wywiadzie lekarskim podana jest konsumpcja (pół)surowych ryb. Natomiast wciąż niewiele jest naukowych danych na temat alergenów Anisakidae. Pierwsze reakcje alergiczne po konsumpcji ryby morskiej, w których wykluczono uczulenie na białko ryby, opisano dopiero w roku 1990. Bardzo często alergię wywołane przez larwy Anisakidae po spożyciu

zanieczyszczonych nimi produktów rybnych, mylone są z odczynami spowodowanymi uczuleniem na białka ryb.

Aby móc skutecznie diagnozować alergię ludzi wywołane antygenami Anisakidae, potrzebne są specyficzne i czułe testy serologiczne do ich wykrywania. Co jest nie mniej istotne, powinna być możliwość wykrywania antygenów Anisakidae w produktach z ryb przeznaczonych do konsumpcji, aby móc takich partii produktów nie dopuścić do obrotu. W celu opracowania odpowiednich testów, wszystkie alergeny muszą być wykryte, a ich struktura musi być dobrze poznana. Doktorant podjął się tego trudnego zadania. Przedstawiona rozprawa doktorska Pana Macieja Kochanowskiego jest niezwykle cenna, wnosi bardzo dużo do istniejącej, na razie fragmentarycznej wiedzy na te tematy.

Rozprawa została sporządzona w postaci jednego obszernego dzieła złożonego z liczącej 72 strony części mającej charakter monografii, za którą znajdują się wydruki publikacji wchodzących w skład rozprawy. Ponadto, osobno dołączono oświadczenia wszystkich współautorów o ich udziale w powstaniu poszczególnych publikacji.

Monografia jest bardzo przejrzysta, ma następujący układ: wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, wykaz stosowanych skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, a następnie przedstawienie obecnego stanu wiedzy w przedmiotowym temacie ze szczególnym uwzględnieniem zagadnienia będącego tematem rozprawy. Uwagę zwraca bardzo obrazowe, nowatorskie przedstawienie układu pracy doktorskiej w postaci ryciny zawierającej zwięzły opis zrealizowanych kolejnych zadań i obok, tytułów publikacji powstałych w wyniku wykonania tych zadań.

Następnie Doktorant omawia obszernie kolejne publikacje wchodzące w skład cyklu. Podobnie pomysłowe jak rycina prezentująca układ pracy doktorskiej, są umieszczone po każdej omówionej publikacji ryciny przedstawiające ich schematy z podaniem wykonanych badań i osiągniętymi wynikami.

Publikacja pierwsza, przeglądowa, systematyzuje wszystkie znane metody detekcji larw Anisakidae w rybach i produktach, z omówieniem zalet, wad oraz zastosowania poszczególnych metod.

Publikacje badawcze B1, B2, B3 poświęcone są analizie antygenów trzech zoonotycznych Anisakidae.

B1 – porównanie antygenów *A. simplex*, *P. decipiens* i *C. osculatum* i opracowanie testu immunoenzymatycznego do serologicznej diagnostyki anisakidozy u ludzi. Opracowany test wdrożono do rutynowego stosowania z Instytucie Parazytologii w Bernie, skąd wywodzą się współautorzy pracy.

B2 - analiza porównawcza profili proteomicznych antygenów *A. simplex*, *P. decipiens* i *C. osculatum*. Doktorant, stosując metody biochemiczne i immunologiczne scharakteryzował antygeny zoonotycznych Anisakidae i przy pomocy odpowiednich programów

komputerowych opracował modele struktury trzeciorzędowej trzynastu alergenów *A. simplex*. Doktorant też wykrył kolejne alergeny i potencjalne alergeny Anisakidae.

B3 - analiza proteomiczna białek *A. simplex* poddanych autoklawowaniu. Doktorant zidentyfikował pięć peptydów pochodzących z alergenów oraz 13 potencjalnych alergenów wykazując tym samym, że autoklawowane produkty rybne mogą stanowić zagrożenie dla uczulonych konsumentów.

B4, do której doprowadziły konsekwentnie poprzednie prace - opracowanie i walidacja metod immunoenzymatycznych do wykrywania antygenów *A. simplex* w przetworach z ryb. Lepszy z testów został wdrożony przez KLR do badań w kierunku obecności antygeny *A. simplex* w produktach rybnych. W ramach tej pracy zbadana została także duża próba dostępnych na rynku polskim przetworów rybnych i określono poziom zanieczyszczenia ich antygenem *A. simplex*.

Doktorant jest pierwszym autorem wszystkich prezentownych publikacji i autorem korespondującym czterech z nich. Sumaryczny IF prac jest bardzo wysoki, wynosi 10.159, a suma punktów MNiSW wynosi 390. Bardzo pozytywnie oceniam rzetelnie i klarownie przedstawienie udziału współautorów poszczególnych prac, który wyrażono procentowo. Udział Doktoranta w każdej z prac jest bardzo wysoki i wynosi w kolejnych: 82%, 56%, 90%, 87% i 85%.

Uwagi.

Wszystkie publikacje z prezentowanego cyklu są bardzo ważne i cenne. Jednakże, o ile uzasadnienie włączenia do cyklu pracy przeglądowej (A1) jest w mojej ocenie przekonujące, to uważam, że praca B1 dotycząca analizy przydatności antygenów *A. simplex*, *P. decipiens* i *C. osculatum* w diagnostyce anisakidozy u człowieka, jakkolwiek jest sama w sobie niezwykle cenna, tym bardziej, że znalazła zastosowanie w praktyce, odbiega tematycznie od pozostałych, nie obejmuje jej tytuł rozprawy. W mojej opinii praca doktorska nie straciłaby nic na swojej wartości gdyby publikacja ta nie znalazła się w cyklu, a byłby on bardziej spójny tematycznie. Drugą opcją byłoby nadanie rozprawie innego, szerszego tytułu.

Doktorant nie uniknął też kilku różnego rodzaju drobnych błędów. Przy bardzo wysokim poziomie merytorycznym rozprawy są one mało istotne. Informuję o tym jedynie z obowiązku recenzenta. I tak:

Doktorant podaje we wstępie ogólny schemat cyklu życiowego nicieni z rodziny Anisakidae. Cykl ten według różnych badaczy różni się jednym szczegółem: według jednych z jaj wykluwają się larwy trzeciego stadium (L3), a według innych - larwy drugiego stadium (L2). Według wszystkich autorów, wolno pływające larwy są zjadane przez skorupiaki. Doktorant pisze, że z jaj wykluwają się larwy L3, które są zjadane przez skorupiaki będące żywicielami pośrednimi, a następnie, nadal w stadium L3 zjadane są z tymi skorupiakami przez ryby, które stają się żywicielami paratenicznymi. Jeśli Doktorant przychyliła się do pierwszej grupy badaczy, skorupiaki, podobnie jak ryby, są żywicielem paratenicznym (inaczej: transportowymi), gdyż

nie następuje w nich przekształcenie w kolejne stadium rozwojowe. Natomiast w drugim opisie cyklu skorupiaki są żywicielami pośrednimi (larwy L2 przekształcają się w L3), a ryby – paratenicznymi.

Inne drobne błędy :

Jest: (tych) szprot, a powinno być: „szprotów”

Sformułowanie: „startery ampifikujące”, powszechnie stosowane przez wielu autorów, jest określeniem żargonowym. Startery flankują amplifikowany fragment DNA, a nie go amplifikują.

Jest: „precyzja wewnątrz testowa”, „precyzja zewnątrz testowa”, a powinno być : „wewnątrztestowa”, „zewnątrztestowa”

Wreszcie drobne błędy interpunkcyjne: np. obecność przecinka po słowie „czy” oraz „niż”, natomiast brak przecinka po „gdyż”.

Wszystkie te drobne błędy wymienione powyżej w żaden sposób nie umniejszają wartości dysertacji, którą oceniam bardzo wysoko.

Pytania.

Pytanie pierwsze: jak można wyjaśnić to, że test serologiczny z antygenem *C. osculatum* jest bardziej czuły niż test z antygenem *A. simplex* w reakcjach z surowicami pacjentów z anisakidozą? Należy się spodziewać, że surowice, które posłużyły do oceny wartości tych antygenów, pochodziły od pacjentów zarażonych *A. simplex* (a więc cierpiących na anisakiozę), a nie *C. osculatum*.

Pytanie drugie dotyczy planów na przyszłość Doktoranta: czy planuje Pan analizę antygeny *Hysterothylacium aduncum*? Wprawdzie nie jest to nicien który może inwadować człowieka, gdyż jest pasożytem wyłącznie ryb, jednak może znajdować się w tkance mięśniowej wielu gatunków ryb wżnych gospodarczo, morfologicznie jest dość podobny do *A. simplex* i wiadomo, że antygen z tego nicienia daje krzyżowe reakcje z antygenami Anisakidae, a więc zapewne może wywołać reakcje alergiczne u człowieka.

Wniosek końcowy.

Tematyka podjęta przez Doktoranta jest bardzo ważna z punktu widzenia zdrowia człowieka. Reakcje alergiczne stanowią coraz większy problem medyczny. Rozpoznanie mechanizmów tych reakcji, poznanie alergenów i potencjalnych alergenów Anisakidae to nowatorskie kierunki badań. Doktorant jest jednym z niewielu naukowców którzy podjęli te trudne a ważne badania, współpracuje z naukowcami z Włoch i Hiszpanii, skąd pochodzi najwięcej przypadków anisakidozy w Europie, a także ze Szwajcarii: Instytut Parazytologii w Bernie, w którym opracowany wspólnie test stosuje się w diagnostyce anisakidozy u ludzi rutynowo. Badania nad możliwościami wykrywania alergenów *A. simplex* w produktach rybnych wydają się jeszcze istotniejsze, jako że opracowane testy będą mogły być wykorzystane w monitoringu rynku produktów rybnych, ewentualnie być podstawą do

eliminacji zanieczyszczonych partii produktów, a tym samym zapobiegać alergiom u uczulonych konsumentów.

W związku z powyższym, z przyjemnością stwierdzam, że dysertacja lek. wet. Macieja Kochanowskiego spełnia wszelkie warunki stawiane rozprawom doktorskim. Mam zaszczyt prosić Wysoką Radę Naukową Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach o dopuszczenie lek.wet. Macieja Kochanowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, ze względu na bardzo wysoką wartość prezentowanej rozprawy: zarówno poznawczą jak i praktyczną, jej nowatorski charakter, wysoki wskaźnik oddziaływania Impact Factor wynoszący 10.159 oraz punktację MNiSW wynoszącą 390 wnoszę o wyróżnienie rozprawy. Uważam, że Doktorant swoją pracą nie tylko przyczynił się do poszerzenia wiedzy w dyscyplinie, którą się zajmuje przy zastosowaniu znanych metod, ale także sam ma udział w tworzeniu narzędzi, które już znalazły praktyczne zastosowanie.



dr hab. n. med. Beata Szostakowska