

Recenzje parazytologiczne  
Wesołowski o wyświecenie  
Prodziekan  
Wydziału Lekarskiego  
ds. Nauk

prof. dr hab. Małgorzata Pawłowska



Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Prof. dr hab. n. med. Danuta Kosik-Bogacka  
Samodzielna Pracownia Botaniki Farmaceutycznej  
Katedra Biologii i Parazytologii Medycznej  
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Szczecin, 29.06.2023 r.

## RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Małgorzaty Smoguły

pt. „Prewalencja chorób wywoływanych przez pierwotniaki pasożytnicze oraz wpływ  
wybranych czynników na ich przeżywalność i wykrywanie na przykładzie  
*Giardia intestinalis* i *Toxoplasma gondii*”

Promotor: dr hab. n. med. Celestyna Mila-Kierzenkowska, prof. UMK

### Ocena formalna:

Temat rozprawy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Smoguły sformułowany został prawidłowo i w pełni oddaje cele oraz założenia badań. Rozprawę doktorską stanowi cykl czterech spójnych tematycznie publikacji dotyczących częstości występowania inwazji wywoływanych przez pasożytnicze pierwotniaki oraz wpływu wybranych czynników fizycznych, chemicznych i biologicznych na przeżywalność i wykrywanie form rozwojowych pierwotniaków na przykładzie *Giardia intestinalis* i *Toxoplasma gondii*. W skład cyklu wchodzi jedna praca przeglądowa i trzy prace oryginalne, które zostały opublikowane w latach 2022-2023 w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Są to następujące prace:

1. Smoguła M., Mila-Kierzenkowska C., Szewczyk-Golec K. The influence of selected factors on the detection of *Giardia intestinalis* by microscopic and immunoenzymatic methods. Iran. J. Parasitol. 2023;18: 30-37 (IF=1.217, MEiN=70 pkt),
2. Smoguła M., Wesołowski R., Pawłowska M., Mila-Kierzenkowska C. Influence of selected factors on the survival assessment and detection of *Giardia intestinalis* DNA in axenic culture. Pathogens 2023;12:316 (IF=4.531, MEiN=100 pkt),

3. Smogula M., Pawłowska M., Wesołowski R., Szewczyk-Golec K., Mila-Kierzenkowska C. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in people at an increased risk of HIV infection – a pilot study. *Diagn. Lab.* 2022;58:9-14 (MEiN=40 pkt),
4. Wesołowski R., Pawłowska M., Smogula M., Szewczyk-Golec K. Advances and challenges in diagnostics of toxoplasmosis in HIV-infected patients. *Pathogens* 2023;12:110 (IF=4.531, MEiN=100 pkt).

Wszystkie prace są opracowaniami zbiorowymi, w trzech z nich Doktorantka jest pierwszym autorem. Sumaryczny współczynnik oddziaływania (*impact factor*, IF) czasopism, w których zamieszczono te prace zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 10.279, a punktacja według Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN) wynosi 310.

Układ pracy doktorskiej jest zgodny z zasadami przyjętymi dla tego typu opracowań, a na podkreślenie zasługuje duża przejrzystość wynikająca z właściwie przyjętej koncepcji przygotowania rozprawy. W rozprawie doktorskiej krótko omówiono przeprowadzone badania. Zawarto w niej kolejno wykaz skrótów, wstęp, cel pracy, opis części doświadczalnej pracy, omówienie wyników z dołączonymi kopiami publikacji, podsumowanie i wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo, wykaz tabel i rycin, a także załączniki. Do rozprawy doktorskiej zostały dołączone pisemne oświadczenia współautorów wyżej wymienionych publikacji o ich udziale w przygotowaniu poszczególnych prac i zgoda Komisji Bioetycznej na wykonywanie opisanych w pracy badań.

#### **Merytoryczna ocena pracy:**

Podjęte przez Doktorantkę badania dotyczą bardzo ważnego problemu związanego z ochroną zdrowia. Giardioza wywołana przez kosmopolitycznego pierwotniaka *G. intestinalis* jest jedną z chorób pasożytniczych przewodu pokarmowego. W Polsce liczba zarażonych osób nie przekracza kilku procent. Inwazja zwykle przebiega skąpoobjawowo lub bezobjawowo. Zarażony pasożytem żywiciel wraz z kałem wydalą formy inwazyjne - cysty, które w wilgotnym środowisku przez długi okres pozostają inwazyjne. Są one odporne na działanie większości środków dezynfekujących, w tym rutynowe chlorowanie wody. W diagnostyce laboratoryjnej w celu wykrycia cyst *G. intestinalis* wykorzystuje się trzykrotne mikroskopowe badanie rozmazów bezpośrednich kału i preparatów uzyskanych po zastosowaniu zagęszczających metod sedymentacyjnych. Ponadto wykorzystuje się wykrywanie swoistych koproantygenów w kale z wykorzystaniem komercyjnych testów immunoenzymatycznych (ELISA). Rzadko bada się treść dwunastniczą, w której poszukuje się trofozoitów *G. intestinalis*. W ostatnim czasie wprowadzono immunochromatograficzne

testy paskowe, ale mają one mniejszą wartość diagnostyczną ze względu na niską ich czułość. Metod molekularnych nie wykorzystuje się w rutynowej diagnostyce giardiozy, a jedynie w badaniach naukowych i epidemiologicznych, do określenia genotypu pasożyta. Zauważono, że wpływ na wykrywanie form pasożyta mogą mieć inne patogeny występujące w kale lub substancje chemiczne.

Innym pierwotniakiem często notowanym w Polsce jest *T. gondii*. Toksoplazmoza jest jedną z najczęściej występujących inwazji oportunistycznych u chorych z obniżonym poziomem odporności, w tym u osób zakażonych wirusem HIV. W przeciwieństwie do osób immunokompetentnych, u których inwazja przebiega najczęściej bezobjawowo, u pacjentów z obniżonym poziomem odporności inwazja ma przebieg ciężki z licznymi powikłaniami, nierzadko kończy się zgonem. Rozpoznanie zarażenia *T. gondii* u pacjentów z upośledzonym układem immunologicznym nie jest łatwe, a wczesne wykrycie zarażenia pasożytem może zapobiec rozwojowi ciężkiej postaci toksoplazmozy. Dlatego badania dotyczące oceny częstości występowania giardiozy oraz toksoplazmozy są bardzo ważne, szczególnie u osób o obniżonym poziomie odporności. Ponadto ważna jest identyfikacja czynników wpływających na przeżywalność i wykrywanie form rozwojowych pierwotniaków zarówno w materiale pobranych od zarażonej osoby, jak i w próbach środowiskowych. Podjęte przez Doktorantkę badania uważam za niezwykle ważne z punktu widzenia zarówno poznawczego, jak również praktycznego.

We wstępie pracy Doktorantka uzasadniła potrzebę prowadzenia badań i przejrzystość przedstawiła podstawy naukowe rozprawy. Uwzględniając aktualne piśmiennictwo mgr Małgorzata Smoguła scharakteryzowała epidemiologię, cykl życiowy, chorobotwórczość i leczenie inwazji wywołanych przez *G. intestinalis* i *T. gondii*. Ta część pracy jest napisana zwięźle, czytelnie i jest bardzo dobrze skonstruowana. Zawiera bogatą dokumentację omawianych zagadnień. Informacje zawarte w tej części pracy świadczą o głębokiej analizie dostępnego piśmiennictwa przed podjęciem badań. Jednak w opisie metod wykorzystywanych w diagnostyce zarażenia *T. gondii* brakuje opisu metody immunofluorescencji pośredniej.

Cele rozprawy doktorskiej są klarowne i zawierają uzasadnienie podjętych badań. Głównymi celami badań była ocena prewalencji chorób wywoływanych przez pasożytnicze pierwotniaki, a także analiza wpływu wybranych czynników fizycznych, chemicznych i biologicznych na przeżywalność i wykrywanie form inwazyjnych jednokomórkowych pasożytów na przykładzie *G. intestinalis* i *T. gondii*.

Rozdział „Część doświadczalna” został podzielony na pięć części stanowiących etapy badań. Rozdział ten został przygotowany starannie i umożliwia innym badaczom powtórzenie badań. Próbkę kału pacjentów badano na obecność odpowiednio: *G. intestinalis* metodami mikroskopową i immunoenzymatyczną (I etap). Następnie do wybranych próbek kału zawierających cysty *G. intestinalis* dodawano szczepy bakteryjne (*Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei* i *Yersinia enterocolitica*), norowirusy i substancje dodawane do żywności (sorbinian potasu, gumę guar, glutaminian monosodowego i kwas cytrynowy), po czym badano próbki metodami mikroskopowymi i immunoenzymatycznymi (etap II). Etap III badań polegał na badaniu żywotności i DNA trofozoitów *G. intestinalis* pochodzących z hodowli aksenicznej poddanych wpływowi wybranych czynników fizycznych i chemicznych, w tym promieniowania UV, temperatury, etanolu, środków dezynfekcyjnych, alkoholu benzyloвого, podchlorynu sodu, formaliny, kwasu cytrynowego, maltodekstryny, cytrynianu sodu, mleczanu wapnia, glikolu propylenowego, benzoesanu sodu, wodorowęglanu sodu i 10% NaOH. Do badań wykorzystano metodę mikroskopową i real-time PCR. Ponadto w surowicy krwi pobranej od osób o wysokim ryzyku zakażenia wirusem HIV oznaczano przeciwciała anti-HIV-1/HIV-2, antygen p24 oraz przeciwciała w klasie IgM i IgG przeciwko *T. gondii* z wykorzystaniem metody enzymoimmunofluorescencyjnej (etap IV). Dokonano także analizy aktualnego piśmiennictwa naukowego dotyczącego metod diagnostycznych wykorzystywanych do wykrywania zarażenia *T. gondii* u osób z obniżonym poziomem odporności (etap V).

Rozdział „Omówienie wyników” jest syntetycznym przedstawieniem wyników badań zawartych w czterech publikacjach Doktorantki. Na początku tej części pracy Doktorantka omówiła niepublikowane dane dotyczące częstości występowania *G. intestinalis* u osób pochodzących z terenu województwa kujawsko-pomorskiego. Analizując dane pacjentów badanych w latach 2000-2018 w Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Bydgoszczy stwierdziła, że częstość występowania *G. intestinalis* u tych pacjentów był zmienny na przestrzeni lat i wynosi od 0,16 do 0,85% (średnio 0,47%).

Celem pierwszej pracy Doktorantki opublikowanej w *Iranian Journal of Parasitology* była analiza wpływu wybranych czynników biologicznych, w tym szczepów bakteryjnych, wirusów oraz substancji chemicznych stanowiących dodatek do żywności na skuteczność wykrywania cyst *G. intestinalis* kale pacjentów. Nie odnotowano wpływu występowania bakterii i wirusów w kale na wynik badania na obecność *G. intestinalis*, natomiast dodanie sorbinianu potasu i kwasu cytrynowego spowodowało spadek wykrywalności pasożyta.

Jednak według mnie wniosek, że kwas cytrynowy dodawany do żywności jako przeciwutleniacz może zwiększać jej bezpieczeństwo przeciwpasożytnicze jest spekulacją.

W pracy zamieszczonej w *International Journal of Molecular Sciences* analizowano wpływ wybranych czynników fizycznych i chemicznych, w tym środków dezynfekujących i konserwujących na ocenę przeżywalności i wykrywanie DNA *G. intestinalis* w hodowli aksenicznej. Brak ruchu trofozoitów *G. intestinalis* stwierdzono w przypadku zastosowania promieniowania UV, różnych wartości temperatury, etanolu, środków dezynfekcyjnych, kwasu cytrynowego E330, benzoenu sodu i 10% roztworu NaOH. Natomiast podchloryn sodu, formalina i wodorowęglan sodu wpłynęły na wykrywanie materiału genetycznego pierwotniaka.

W pracy zamieszczonej w *Diagnostyce Laboratoryjnej* analizowano miano przeciwciał przeciwko *T. gondii* w surowicy osób o wysokim ryzyku zakażenia wirusem HIV pochodzących z województwa kujawsko-pomorskiego. U ponad połowy badanych stwierdzono przeciwciała klasy IgG przeciwko *T. gondii*, natomiast u żadnej z badanych osób nie stwierdzono przeciwciał klasy IgM. Wysoki wskaźnik awidności przeciwciał IgG odnotowano w ponad 90% próbek seropozytywnych. Wirusa HIV wykryto u jednego pacjenta, u którego stwierdzono również przeciwciała przeciwko *T. gondii* w klasie IgG. Wyniki badań dowodzą wysokiej seroprewalencji *T. gondii* wśród badanych osób z grupy wysokiego ryzyka zakażenia wirusem HIV.

W czwartej pracy zamieszczonej *Pathogens* dokonano przeglądu metod diagnostycznych wykorzystywanych do wykrywania zarażenia *T. gondii* u ludzi, zwracając szczególną uwagę na pacjentów zakażonych wirusem HIV. Zauważono, że metody molekularne są metodami czułymi i specyficznymi pozwalającymi na właściwe monitorowanie przebiegu inwazji, zwłaszcza u pacjentów zakażonych wirusem HIV.

Przedstawione do oceny prace mają dużą wartość merytoryczną. Są oryginalnymi opracowaniami aktualnego i istotnego problemu dotyczącego epidemiologii i diagnostyki zarażenia *G. intestinalis* i *T. gondii*. A wyniki w znacznym stopniu poszerzają wiedzę dotyczącą wpływu różnych czynników na cysty i trofozoity *G. intestinalis*. Problemy badawcze podjęte przez Doktorantkę są bardzo istotne, opracowanie zawiera elementy nowatorskie i wnosi nowe dane w zakresie biologii medycznej. Świadczy to także o bardzo dobrej znajomości przedstawionego problemu. Badania były dobrze zaplanowane, przeprowadzone, a ich wyniki opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych. Mają one charakter nowatorski o charakterze poznawczym. Ponadto Doktorantka wykazała się dużymi umiejętnościami w krytycznym omówieniu otrzymanych wyników. Wysoki

poziom naukowy opublikowanych prac i znaczący w nich udział Doktorantki dokumentuje bardzo dobre opanowanie warsztatu badawczego.

Na podstawie uzyskanych wyników Pani mgr Małgorzata Smoguła stwierdziła, że występowanie innych organizmów w kale nie wpływa na wynik badania w kierunku *G. intestinalis* z wykorzystaniem metod mikroskopowych i immunoenzymatycznych, natomiast kwas cytrynowy zmniejsza wykrywalność tego pierwotniaka. Badane czynniki fizyczne i chemiczne wpływają na wykrywalność trofozoitów *G. intestinalis* pochodzących z hodowli aksenicznej, w przeciwieństwie do metody real-time PCR. Nie stwierdzono ostrej fazy toksoplazmozy u osób badanych w kierunku obecności wirusa HIV.

Piśmiennictwo zawiera 66 aktualne pozycje. Na podkreślenie zasługuje zarówno trafny ich dobór, jak i aktualność.

W streszczeniu Doktorantka przedstawiła podsumowanie zagadnień omówionych w publikacjach.

Doktorantka w kilku miejscach nie ustrzegła się drobnych błędów. Na przykład na stronie 8 jest napisane przegląd epidemii chorób przenoszonych przez wodę oraz zarażona osoba może wydalać około 108 do 1010 cyst dziennie aby doszło do zarażenia, na stronie 9 mitochondria oddechowe, podłużne podwójne rozszczepienie (strona 10), ogrodnictwo gołymi rękami (strona 16) i w suchych warunkach (strona 17). Uwagi te wynikają z obowiązku recenzenta, ale nie wpływają na wartość merytoryczną ocenianej pracy.

Podsumowując - przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma dużą wartość merytoryczną, stanowi wartościowe i interesujące opracowanie naukowe. Problemy badawcze podjęte przez Doktorantkę są bardzo istotne, opracowanie zawiera elementy nowatorskie i wnosi nowe dane w zakresie nauk medycznych. Świadczy to także o bardzo dobrej znajomości przedstawionego problemu i umiejętności posługiwania się różnymi metodami badawczymi. Badania były dobrze zaplanowane i przeprowadzone. Doktorantka wykazała się dużymi umiejętnościami w krytycznym omówieniu otrzymanych wyników.

#### **Uzasadnienie:**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Małgorzaty Smoguły w pełni spełnia warunki określone w ustawie dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym, oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r., poz. 1789 ze zm.). Dlatego zatem do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy o dopuszczenie Pani mgr Małgorzaty Smoguły do

dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z uwagi na nowatorski charakter badań, ich kompleksowość i dużą wartość merytoryczną wnioskuję do Wysokiej Rady o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Małgorzaty Smoguley.

PROFESOR  
Katedry Biologii i Parazytologii Medycznej  
prof. dr hab. n. med. i n. zdr. Danuta Kosik-Bogacka

