WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Zakład Biologii Ogólnej i Parazytologii

Warszawa, 21 sierpnia 2018 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej lek. wet. **Dawida Jańczaka**

p.t.

„OCENA ZOONOTYCZNYCH CZYNNIKÓW RYZYKA ZARAŻENIA CZŁOWIEKA PIERWOTNIAKIEM TOXOPLASMA GONDII NA TERENIE POLSKI"

Podstawą do sporządzenia niniejszej recenzji jest pismo prof. dr hab. Krzysztofa Chomiczewskiego Przewodniczącego Rady Naukowej NIZP-PZH oraz dr Grzegorza Juszczyka Dyrektora NIZP-PZH, z dnia 18 maja 2018 roku.

Recenzowana rozprawa została przygotowana w Zakładzie Parazytologii i Chorób Przenoszonych przez Wektory 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 zajmuje 102 strony. Część uzupełniającą stanowi Piśmiennictwo – obejmujące 324 pozycje (w większości anglojęzyczne), Wykaz tabel i Spis ilustracji. Wykaz stosowanych skrótów, znajduje się na początku rozprawy i nie został zawarty w spisie treści. Całość rozprawy zamyka się na 130 stronach.

Na podstawie rozprawy lek. wet. Dawid Jańczak aplikuje o stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej. W poniższej recenzji skupiłem się na kryteriach oceny dostosowanych do wymagań stawianych rozprawom doktorskim.

Wybrany temat rozprawy uważam za jak najbardziej uzasadniony. Analizując dostępne w bazach danych zestawienia bibliometryczne łatwo się zorientować, że zagadnienie toksoplazmozy pozostaje aktualne i to nie tylko ze względu na zalecenia medyczne. Wywoływana przez pierwotniaka *Toxoplasma gondii* toksoplazmoza jest jedną z najczęstszych parazytoz człowieka na świecie. Odsetek osób seropozytywnych wynosi od 5% do 90%, a w populacji polskiej odsetek ten waha się między ok. 36,0% do ok 63%. W cyklu życiowym tego pasożyta niezbędnym ogniwem są żywiciele ostateczni, którymi są koty. Jednak mimo rozpowszechnionego w społeczeństwie stereotypu kota, jako głównego zagrożenia, to nie kontakt z kotem jest najczęstszym źródłem zarażenia. Zwykle jest

ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa
tel. 0-22 621-26-07, faks: 0-22 628-53-50
e-mail: biologia@wum.edu.pl
http://biologia.wum.edu.pl

nim spożycie niedogotowanego bądź surowego mięsa zakażonego tachyzoitami lub bradyzoitami tego pierwotniaka. U osób zdrowych toksoplazmoza może wywoływać objawy grypopodobne, j w większości przypadków przebiega bezobjawowo. Może ona jednak powodować poważne konsekwencje zdrowotne w przypadku niemowląt urodzonych przez zarażone matki i osób o osłabionym układzie odpornościowym. Ponadto liczne badania wskazują na istotną dodatnią korelacje pomiędzy występowaniem bezobjawowej toksoplazmozy, a chorobami psychicznymi (choroba dwubiegunowa, schizofrenia, autoagresja itd.), podejmowaniem zachowani ryzykownych i popełnianiem samobójstw. W związku z tym pasożyt ten może prawdopodobnie wpływać bezpośrednio również na stan teoretycznie zdrowych i bezobjawowych nosicieli. Zatem konsekwencje społeczne i zdrowotne zarażenia *T. gongii* mogą być poważniejsze niż wcześniej sądzono. W zawiązku z tym, najlepszym podejściem w walce z toksoplazmozą człowieka jest jej zapobieganie. Skuteczna prewencja nie jest możliwa bez dokładnego poznania czynników ryzyka zarażenia występujących w świecie i w lokalnych populacjach ludzkich. Właśnie czynników ryzyka zarażenie człowieka w Polsce dotyczy przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska przygotowana przez lek. wet. Dawida Jańczaka. Wyniki przeprowadzonych przez niego badań, poza oczywistą wartością poznawczą, mogą mieć także zastosowanie praktyczne i wskazać te czynniki, które w największym stopniu mogą przyczyniać się do rozprzestrzeniania *T. gondii* w środowiski i populacji ludzkiej w Polsce.

Rozprawa doktorska lek. wet. Dawida Jańczaka ma typową strukturę. Po spisie treści doktorant zamieszcza wykaz skrótów. We wstępie prezentowany jest przegląd dostępnej literatury, nastepnie cele pracy, opis materiału i metod, po czym doktorant przechodzi do prezentacji uzyskanych wyników badań, które dokładnie dyskutuje w rozdziale „Dyskusja" z odpowiednio dobranymi pozycjami literaturowymi (głównie obcojęzycznymi). Całość części merytorycznej rozprawy zamykają wysunięte przez doktoranta wnioski oraz krótkie podsumowania. Bibliografia zawierająca 324 pozycje dobrana jest prawidłowo i ściśle związana z tematem rozprawy.

Ze względu na powierzona mi rolę pozwolę sobie pomiąć szczegółowy opis zawartych w rozprawie treści i ograniczyć się do najważniejszych uwag, co jest właściwą istotą recenzji rozprawy doktorskiej, jako pracy naukowej.

Część merytoryczną doktorant rozpoczyna od zajmującego 21 stron **Wstępu**, w którym w sposób stosunkowo szczegółowy przedstawia aktualny stan wiedzy związany z biologią pasożyta, charakterystyką genetyczną, źródłami i drogami zarażenia oraz występowaniem *T. gondii* u różnych gatunków zwierząt. Wstęp doktorant rozpoczyna od krótkiego rysu historycznego, wspomina że gatunek ten został po raz pierwszy opisany w 1908 roku. Jednak praca, którą cytuje w tej części

wstępu ukazała się w 1909 roku. Według mojej wiedzy *T. gondii* zostałą odkryta przypadkowo w 1908 przez Charles'a Nicolle'a, który pracował w Północnej Afryce poszukując rezerwuarów Leishmania. Tu właśnie pojawia się pierwszy opis pasożyta (patrz Nicolle, C., L. Manceaux, 1908. Sur une infection A corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. 147, 763–766) i dopiero później po raz kolejny w 1909. Chcąc przedstawić publikację, w której znajdziemy pierwsze informacje o tym gatunku należałoby się powołać na tę właśnie publikację. Przydałoby się uwzględnić także publikację Alfonso Splendore, (1908), który pracując w Sao Paulo mniej więcej w tym samym czasie odkrył podobnego pasożyta w królikach (Un nuovo protoaz parassita de'conigli incontrato nelle lesioi anatomiche d'une malatti che ricorda in molti punti il Kala-azar dell' umo. Nota prelininaire pel. Rev. Soc. Sci. Sao. Paulo. 3, 109–112). Chcąc być konsekwentnym w przedstawianiu historii odkrycia warto byłoby wspomnieć, kto zaliczył *T. gondii* do kokcydiów.

Drobna uwaga dotyczy używania pełnej (*Toxoplasma gondii*) i skróconej (*T. gondii*) nazwy gatunkowej. Skoro już na początku wstępu pojawia się pełna nazwa gatunku, to nie ma potrzeby jej stosowania w dalszej części tekstu rozprawy. Wystarczy się ograniczyć do nazwy skróconej.

W początkowej części wstępu doktorant wymienia osoby zakażone wirusem HIV, jako szczególnie narażone, czy chodzi tu raczej o pacjentów niepoddanych leczeniu lub tych z AIDS? Odnośnie ryzyka u pacjentów poddanych immunosupresji, to ciekawi mnie czy jest ono związane z jej rodzajem czy nie ma to znaczenia?

Dalej autor omawia występowania pasożyta w świecie. Omawiając rozpowszechnienie i seroprewalencję toksoplazmozy warto powołać się na pracę Wilking et al. (2016) (Sci Rep. 2016; 6: 22551), gdzie autorzy przedstawiają dokładną analizę najnowszych danych epidemiologicznych etc. w Niemczech, czyli kraju tuż za naszą granicą. Publikacji tej nie znalazłem również w dyskusji wyników.

W kolejnych częściach znajdziemy, krótką prezentację metod diagnostycznych i leczenia toksoplazmozy oraz pozycję taksonomiczną i zarys biologii tego pierwotniaka. W opisie dotyczącym bradyzoitów znalazłem stwierdzenie „Bradyzoity otaczają się cienką (< 0,5 μm) ścianą z tkanki łącznej i kontynuują swoje podziały komórkowe tworząc w ten sposób cystę tankową. Z biegiem czasu cysty rozrastają się dostosowując się do kształtu komórki i mogą zawierać nawet do kilkuset bradyzoitów". O ile mi wiadomo ścianę cysty tkankowej tworzy materiał pochodzący z zajętej przez pasożyta komórki i ten pochodzenia pasożytniczego. Proszę o wyjaśnienie, w jaki sposób bradyzoity otaczają się tkanką, jaką jest tkanka łączna i tworzą w ten sposób cystę tkankową. Przypuszczam, że jest to przejęzyczenie wynikające z tłumaczenia tekstów obcojęzycznych i późniejszych etapów przygotowywania rozprawy.

Po szczegółowej części opisującej biologię pasożyta doktorant przedstawia, po krótce, charakterystykę genetyczną. Moim zdaniem powinien był w tym miejscu poświęcić więcej miejsca na omówienie dostępnej w tym zakresie literatury, szczególnie w dobie osiągnięć genomiki. Omawia on tu trzy główne linie klonalne, brakuje jednak nieco bardziej szczegółowego przedstawienia prac, których wyniki zostały uzyskane w oparciu o sekwencjonowanie genomowe. Autor zwraca uwagę na zróżnicowaną wirulentność szczepów, co jest niezwykle ważne z punktu widzenia klinicznego. Można by się tu pokusić o dodanie kilku zdań opisujących, z czego ta zmienność obrazu klinicznego może wynikać. Wiadomo na przykład, że różne szczepy *T. gondii* wywołują zróżnicowaną odpowiedź immunologiczną. Tę część wstępu warto uzupełnić również o wyniki badań wskazujące na zarażenie oocytami, jako powodujące cięższe objawy kliniczne niż te występujące po zarażeniu cystami tkankowymi. Z pewnością uatrakcyjniłoby to zamieszczony opis i pozwoliło czytelnikowi poznać mechanizmy z tym związane.

W części wstępu związanej ze źródłami zarażenia warto rozdzielić te związane z oocystami od cyst tkankowych i tachyzoitów. Z czystej ciekawości zadam w tym miejscu doktorantowi pytanie. Czy są mu znane prace, w których jako możliwą drogę zarażenia podaję się wniknięcie pasożyta przez uszkodzoną/zranioną skórę? Jedną z metodą zarażania zwierząt laboratoryjnych jest droga podskórna lub dootrzewnowa. W związku z tym czy np. pracownik rzeźni, pracujący z surowym mięsem i narażony na skaleczenia również może zarazić się przezskórnie?

Doktorant wspomina, że „Częste są zarażenia poprzez przeszczepy narządów i tkanek" czy tak jest rzeczywiście? Jaki jest to odsetek i czy stosuję się lub powinno stosować profilaktykę anty-toksoplazmozową u biorców przeszczepu?

Wstęp kończy się omówieniem występowania toksoplazmozy u zwierząt. Z wiadomych powodów autor zaczyna od omówienia kotów domowych. Informacje te uzupełniłbym jedynie o dane dotyczące czasu trwania siewstwa u kotów. Dalej omawiane są kolejne grupy zwierząt. W tej części brakuje omówienia występowania *T. gondii* u ptactwa i zwierząt zmiennocieplnych. Obie grupy zwierząt są częstym składnikiem diety, a więc spożywanie pozyskanego z nich i niedogotowanego mięsa wiąże się z ryzykiem tokspolazmozy. Warto w tym miejscu zastanowić się, dlaczego doktorant szerzej nie ujął w swych badaniach mięsa ptaków, jako możliwego zoonotycznego czynnika ryzyka zarażenia. Ponadto we wstępie nie znalazłem informacji, jakie czynniki i w jaki sposób wpływają na żywotność/inwazyjność oocyst. We fragmentach związanych z przenikaniem tachyzoitów do mleka brak jest informacji dotyczących mleka krowiego, ludzkiego oraz tych przedstawianych w pracach z wykorzystaniem eksperymentalnie zarażonych szczurów. Doktorant wspomina o publikacji Dubey'a (1986), gdzie podaje on mleko krowie, jako potencjalne źródło zarażenia się *T. gondii*. Jednak informacja ta znalazła się w miejscu oderwanym od opisu danych dla mleka kóz i owiec.

Warto podkreślić, że doktorant w tej części rozprawy zawraca uwagę na te aspekty biologii i epidemiologii pasożyta, które można zastosować praktycznie w profilaktyce toksoplazmozy (mięso oraz potrawy uważanie za ekskluzywne [Carpaccio z dziczyzny etc.], odpowiednia edukacją właścicieli kotów, grupy ryzyka). Ponadto wskazuje na ograniczone dane epidemiologiczne prewalencji występowania toksoplazmozy u zwierząt w Polsce. Wskazuje to na konieczność przeprowadzenia na terenie całego kraju szeroko zakrojonych, wieloośrodkowych badań epidemiologicznych w tym zakresie.

Po wstępie doktorant przedstawia **Cel pracy**, a raczej cele pracy. Cały pierwszy akapit poprzedzający wymianę celów pracy uważam za zbędny i powinien być przeniesiony do wstępu. Z obowiązku recenzenta musze zwrócić uwagę na, częsty w pracach doktorskich, brak hipotezy badawczej. Dobrze było by, aby taka hipoteza, do której weryfikacji (pozytywnej lub negatywnej) służy realizacja celów badawczych, pojawiła się w akapicie podsumowującym wstęp lub poprzedzającym cele. Niemniej z pewnością obierając temat i wyznaczając zadania badawcze doktorant wiedział, co chce nimi zweryfikować.

Głównym celem pracy, postawionym przez doktoranta, była ocena zoonotycznych czynników ryzyka nabycia przez człowieka zarażenia *T. gondii* na terenie Polski. Do jego realizacji doktorant wyznaczył trzy cele szczegółowe. Pierwszym było określenie częstości występowania przeciwciał IgG przeciwko *T. gondii* wśród wybranych zwierząt domowych, hodowlanych oraz w grupie praktykujących lekarzy weterynarii. W tym miejscu zastanawia mnie, dlaczego wybrani zostali wyłacznie praktycy weterynaryjni. Może warto było rozważyć włączenie innych grup zawodowych np: hodowcy zwierząt, myśliwi itp. Drugim z celów szczegółowych było określenie częstości występowania materiału genetycznego *T. gondii* w mleku owczym i kozim oraz w tkankach wybranych zwierząt hodowlanych i dziko żyjących. Mimo rosnącego spożycia mleka i wyrobów mlecznych wytwarzanych z mleka koziego i owczego, produkty te są stosunkowo mało popularne. Zastanawia mnie, dlaczego do badań nie było włączone najpopularniejsze w Polsce mleko krowie. Trzecim z nich była charakterystyka genetyczna szczepów *T. gondii* wyizolowanych od ludzi i zwierząt w latach 2006-2017. Według mnie cel ten wymaga doprecyzowania, konkretne izolaty były przypisywane do linii klonalnych na postawie analiz RFLP. Metoda ta nie wskazuje rzeczywistego stopnia polimorfizmu, a zatem może błędnie klasyfikować warianty ze względu posiadaną homoplazję lub po prostu na niewystarczającą zdolność rozdzielczą. Moim zdaniem, aby podać charakterystykę genetyczną szczepów należałoby zastosować sekwencjonowanie regionów genomowych ujawniające pełną różnorodność genetyczną, w tym polimorfizmy pojedynczego nukleotydu oraz małe insercje i delecje. Sekwencjonowanie genomowe na ogół wykrywa znacznie większą różnorodność genetyczną niż inne metody. Dobrym przykładem na to są wyniki zaprezentowane przez Fazaeli i wsp. (2000) wskazujące na wysoki stopień polimorfizmu

obserwowany w locus GRA6 przez sekwencjonowanie (dziewięć sekwencji allelicznych z 30 szczepów), podczas gdy analiza PCR-RFLP wykryła tylko trzy grupy. Rozumiem jednak, że na drodze do głębokiej charakterystyki genetycznej mogą stać związane z tym koszty. Mimo to cele zostały sformułowane prawidłowo i ich konsekwentna realizacja prowadzi do osiągnięcia celu głównego.

Rozdział **Materiał**, dodatkowo zilustrowany tabelami, przedstawia zebrane przez doktoranta próby, choć częściowo opisuje on w nim metody ich pozyskiwania. W takim wypadku zręczniej byłoby opisać materiały i metody w jednym rozdziale. Doktorant nie podaje szczegółów uzyskiwania surowicy z krwi koni i innych zwierzą ani temperatury i czasu jej przechowywania. Zwykle, aby otrzymać surowicę odwirowuje się krew z uzyskanym w temperaturze pokojowej skrzepem. W niemal całym tekście rozprawy doktorant posługuje się RPM zamiast G dla podania warunków wirowania i jest to 2000rpm. Na tej podstawie, bez danych technicznych dotyczących modelu wirówki, trudno jest ocenić czy jest to prędkość odpowiadająca 1500-2000G, standardowo stosowanym do uzyskiwania surowic. W podrozdziale 3.4. tabela 8 i 9 doktorant prezentuje badane próby tkanek zwierząt hodowlanych. Proszę o informacje, czym kierował się doktorant wybierając taki, a nie inny mięsień. Czy mięśnie te są znanymi miejscami predylekcji, czy też chciał zbadać, które części zwierzęcia niosą za sobą największe ryzyko występowania tachyzoitów i/lub cyst tkankowych?

Użyte przez doktoranta **Metody** są dość szczegółowo opisane w rozdziale pod tym samym tytule. Metody zostały dobrane odpowiednio do zaplanowanych w pracy zadań badawczych i postawionych celów. W podrozdziale 4.1.3. „Ocena mikroskopowa uzyskanych preparatów" doktorant podaje powiększenia obiektywów (100x i 400x???) nie podając powiększeń okularu i/lub powiększenia całkowitego. Przypuszczam, że podane przez doktoranta powiększenia obiektywów to właśnie brakujące powieszenia całkowite.

Moja zasadnicza uwaga dotycząca tej części rozprawy związana jest z testem zastosowanym do badania surowic krwi zwierząt i ludzi metodą aglutynacji bezpośredniej tj użycia testu Toxo-Screen (BioMerieux). Wszystkie badania zostały przeprowadzone tym samym testem niezależnie od gatunku zwierzęcia. Dlaczego został wybrany akurat test dedykowany badaniu surowic ludzkich? W jaki dokładnie sposób została przeprowadzona walidacja testu? Wydaje się, że badając surowice pobrane od różnych gatunków warto zastosować test typu „mulispecies". Ponadto Sukthanna et al. (2001) wskazują na możliwe ograniczenia wykorzystania testu Toxo-Screen w badaniach skriningowych.

Doktorant nie wyjaśnia czy izolował DNA z całości pobranych tkanek. Podaje jedynie informację, że używał do tego celu 100-150ug tkanki. Czy analizie poddane były całe pobrane przez doktoranta tkanki/narządy? Przyjmując, że waga serca świni to ok. 250g trudno jest sobie wyobrazić,

żeby pobierając materiał o masie 0,5g, a z niego 150ug trafić na miejsce, w którym znajduje się pasożyt. Jakie kryteria zostały zastosowane do wyboru fragmentów tkanek poddanych późniejszym badaniom genetycznym? Jeżeli analizie nie była poddawana cała tkanka to ile prób zostało z niej pobranych i czy były pobierane z różnych miejsc tej samej tkanki?

W części dotyczącej izolacji DNA z mleka ponownie doktorant stosuje RPM, a nie wartość G, w odniesieniu do warunków wirowania. Nie znalazłem tu również informacji, czy po wirowaniu została usunięta powierzchniowa warstwa tłuszczu, która może przeszkadzać w dalszych etapach procedury. Metoda zastosowana do izolacji DNA z mleka jest prawidłowa jednak w przyszłości warto pamiętać, że wskazuje się na użycie gotowych zestawu do izolacji, jako najefektywniejszych (Volk et al. Journal of Food and Nutrition Research 2014).

W tabeli 11 wymienione zostały startery użyte w badaniach, jednak cytowana jest praca Dubey'a i wsp. (2006). Czy wszystkie zamieszczone startery zostały wykorzystane w trakcie realizacji pacy doktorskiej? Jeśli tak, to czy wszystkie uzyskane produkty zostały zsekwencjonowane i zdeponowane w odpowiednich bazach danych? W dalszej części znalazłem informację, że sekwencjonowany był jedynie fragment genu B1. Dlaczego pozostałe produkty nie zostały oddane do sekwencjonowania, skoro jeden z celów zakłada charakterystykę genetyczną występujących w Polsce szczepów *T. gondii*?

Ponieważ praca doktoranta dotyczyła zoonotycznych czynników ryzyka, prosze o wyjaśnienie, dlaczego w badaniach nie był wykorzystywany sok mięsny. Wszak wielokrotnie wykazano, że serologia soku mięsnego (MJS) jest doskonałą metodą wykrywania zakażenia *T. gondii* przy uboju różnych gatunków, w tym badanych przez doktoranta gatunków zwierząt. Metoda ta została potwierdzona, jako dobrze korelująca z serologią surowicy (Basso i wsp., 2013; Meemken i wsp., 2014; Bacci i wsp., 2015). W odniesieniu do podjętego tematu badań brak tego typu analiz jest słabą stroną rozprawy. Moim zdaniem wyniki uzyskane na soku mięsnym znacznie wzbogaciłyby rozprawę i pozwoliły na pełniejszą analizę pozyskanych przez doktoranta wyrębów mięsnych i innych tkanek. Szczególnie, że sam doktorant na początku trzeciego akapitu (strona 79) wspomina, że w badaniach zwierząt rzeźnych zamiast surowicy wykorzystuje się sok mięsny. Innym rekomendowanym do badań nad toksoplazmozą narządem jest mózg. Czy było rozważane użycie tkanki mózgowej, jako reprezentatywnej dla wszystkich gatunków zwierząt wykorzystanych w doktoracie?

Rozdział **„Wyniki"** przedstawia oryginalne osiągnięcia doktoranta i został bogato zilustrowany licznymi tabelami i wykresami. Rozdział ten nie budzi moich większych zastrzeżeń, a przedstawione wyniki są liczne i zróżnicowane, co świadczy o nakładzie pracy, jaki został włożony w powstanie rozprawy. Doktorant przedstawia rezultaty swoich badań w sposób niestandardowy. Wszystkie wyniki przedstawione są w punktach, co jest raczej charakterystyczne dla podsumowania.

Musze jednak przyznać, że forma ta ułatwia zapoznanie się z rezultatami badań i ogranicza ilość zbędnego tekstu. Mak kilka pytań związanych z ta częścią rozprawy. Czy wiadomo, jakim testem zostały uzyskane wyniki dla podrozdziału 5.2.1. „Występowanie przeciwciał IgG przeciwko *Toxoplasma gondii* w surowicach kotów z Warszawy i okolic pozyskanych z Weterynaryjnego Laboratorium Diagnostycznego w Warszawie" i jaki był udział doktoranta w tych badaniach? Czy są to wyniki ogólnodostępne mogące być podstawą innych rozpraw i/lub publikacji? Kto ma prawo do uzyskanych w ramach tych testów wyników? Podobne pytanie mam odnośnie podrozdziału 5.2.2. 5.2.2 „Występowanie przeciwciał IgG przeciwko *Toxoplasma gondii* u kotów z pięciu województw zbadanych w ramach projektu: „Ocena Zdrowia Kotów w Polsce".

W podrozdziale 5.2.2. pojawia się skrót PR, którego wyjaśnienie można znaleźć pod tabelą umieszczoną dwie strony dalej. Rozwinięcie skrótu powinno być umieszczone wcześniej a sam termin „nieskorygowany iloraz prewalencji" wyjaśniony w sekcji Metody.

Tabelę 18 ze strony 62 proponowałbym uzupełnić o gatunek zwierzęcia, z którego pochodzi analizowana próbka.

Punkt 5 podrozdziału 5.7 5.7 „Wyniki genotypowania wielomarkerowego" powinien być precyzyjniej wyrażony podczas formułowania wniosku „O pojawianiu się nowych szczepów *T. gondii* na terenie Polski świadczy wykrycie po raz pierwszy w próbach materiału ludzkiego pierwotniaków należących do I linii klonalnej". Stwierdzenie I linii klonalnej, w materiale ludzkim niekoniecznie świadczy o tym, że szczepu tego w Polsce wcześniej nie było. O ile mi wiadomo I linia klonalna była stwierdzana w materiale zwierzęcym. W związku z tym wniosek ten należy dostosować do uzyskanych wyników.

Rezultaty badań doktoranta wskazują, że koty rzadko są siewcami oocyst, te aplikant znalazł w kale jednego dorosłego kota w wieku 6 lat. Zwraca on również uwagę na inne czynniki zoonotyczne mogące być przenoszone przez koty takiej jak np: *Giardia intestinalis* czy *Toxocara cati*. Doktorant potwierdza obserwacje innych autorów, że istotnym czynnikiem ryzyka jest karmienie zwierząt surowym mięsem i pozwalanie im na polowanie. Ponadto wyniki uzyskane przez doktoranta dostarczają dodatkowych informacji o występowaniu *T. gondii* u zwierząt gospodarskich. Mam nadzieję, że badania te będą kontynuowane przy użyciu odpowiednio dobranych i dedykowanych do nich testów. Badając lekarzy weterynarii doktorant potwierdza również, że prawdopodobieństwo stwierdzenia toksoplazmozy zwiększa się wraz z wiekiem i wiąże się ze spożywaniem surowego mięsa i nie ma związku z wykonywaniem tego zawodu.

Dyskusja, zawarta na 24 stronach została podzielona na cztery podrozdziały. Doktorant prezentuje w niej swoje oryginalne rezultaty na tle obecnego stanu wiedzy. Całość tego rozdziału poprowadzona jest w sposób konsekwentny i spójny. Poza omówieniem wyników własnych, aplikant przedstawia ciekawe informacje uzupełniające, co razem ze wstępem stanowi kompendium

podstawowej wiedzy w podjętym przez doktoranta temacie. Doktorant wykazuje w niej umiejętność prowadzenia dysputy naukowej i selektywnego wyszukiwania danych literaturowych. Przedstawiając dostępną literaturę doktorant nie uniknął niewielkich błędów. Już na początku dyskusji pisze on „Koty... jedynie u nich zachodzi pełen cykl rozwojowy". Nie jest to prawdą, ponieważ cykl rozwojowy *T. gondii* zachodzi również u innych kotowatych takich jak żbik, ryś itd.

Pod koniec podrozdziału 6.1. 6.1 „Ocena rozpowszechnienia zarażenia *Toxoplasma gondii* u kotów" można znaleźć obszerny fragment dotyczący wykorzystania technik molekularnych do wykrywania *T. gondii* w próbach wody. Zakończony jest on zdaniem „Wszędobylstwo oocyst *Toxoplasma* szczególnie w przypadku trawożernych ssaków może sprzyjać nabyciu zarażenia". O ile dobrze kojarzę koty nie należą do trawożernych ssaków. Zatem proszę o wyjaśnienie jak ten fragment ma się do rozpowszechnienia zarażenia *T. gondii* u kotów i wyników uzyskanych w trakcie realizacji zadań badawczych?

Podrozdział 6.2, w którym doktorant omawia rozpowszechnienie zarażenia *T. gondii* wśród zwierząt hodowlanych i dziko żyjących powinien być, moim zdaniem, podzielony na koleje podrozdziały np: 6.2.1. Konie, 6.2.2. Bydło itd.

Na stronie 79 rozdziału Dyskusja, doktorant wspomina, że do celów pracy zbadał 110 krów. Wydaje mi się, że powinien podać informację z jakiego typu hodowli pochodziły. Jeśli był to chów oborowy i wolny, to zwierzęta powinny być podzielone na dwie grupy badane. Pozwoliłoby to stwierdzić czy i w jaki sposób typ hodowli może wpływać na występowanie toksoplazmozy u krów.

Omówienie toksoplazmozy u trzody chlewnej wydaje się zbyt pobieżne. Niemal 10 lat temu Dubey (2009) opublikował pracę przeglądową „Toxoplasmosis in pigs—The last 20 years", w której cytuje znacznie więcej publikacji niż tych zamieszczonych w rozprawie przez doktoranta. Spożycie mięsa wieprzowego w Polsce jest bardzo wysokie, dlatego akurat w tym przypadku spodziewałbym się lepszego omówienia sytuacji panującej naszym kraju w porównaniu z dostępnymi danymi literaturowymi.

Jak doktorant wytłumaczy fakt braku przeciwciał IgG u owiec, w których mleku stwierdzono materiał genetyczny pierwotniaka? Informacja te jest powtórzona na kolejnej stronie. Doktorant nie stwierdził obecności DNA pasożyta w żadnej z pobranych prób mleka kóz. Czy próbował w tym celu zastosować inna metodykę np. real-time PCR?

Uważam, że w szeregu prezentowanych w dyskusji danych należałoby lepiej uwydatnić osiągnięcia doktoranta. Obecnie giną one w gąszczu literatury. Ponadto każdy z podrozdziałów mógłby kończyć się krótkim podsumowaniem, w którym doktorant wskazywałby na luki w wiedzy i wskazywał dalsze postępowanie.

Pomimo, że doktorant nie badał możliwości zarażenia się człowieka przez spożycie mięsa drobiowego i ptactwa łownego, a szkoda, to dobrze byłoby o tym wspomnieć w dyskusji lub wstępie do rozprawy. Tym bardziej, że w materiale badawczym doktoranta ptactwo łowne było uwzględnione.

Jednymi z najciekawszych badań przeprowadzonych i dyskutowanych przez doktoranta jest analiza płynu owodniowego przeprowadzona na bardzo licznych próbach. Efektem tego było stwierdzenie, po raz pierwszy, występowania I linii klonalnej u ludzi w Polsce. Moim zdaniem nie daje to jednak podstaw do formułowania stwierdzenia, że uzyskane wyniki wskazują na pojawianie się nowych szczepów na terenie Polski.

Podsumowujące wyniki **„Wnioski"** są ciekawe i mogą mieć znaczenie praktyczne. Zostały sformułowane na bazie uzyskanych rezultatów i klarownie przedstawione. Jednak Wniosek 4 wymaga drobnych zmian kosmetycznych i doprecyzowania, zgodnie z uwagami zamieszczonymi przeze mnie powyżej.

Całość rozprawy zamyka **streszczenie** w języku polskim i angielskim. Oba streszczenia kończą się wnioskami wysnutymi przez doktoranta. W streszczeniu anglojęzycznym brakuje wniosku czwartego. Nie czuję się kompetentny do oceny poprawności językowej streszczenia obcojęzycznego, jednak według mnie wymaga ono niewielkich korekt, np: słowo „province" powinno zostać zastąpione przez „voividship". Niemniej oba streszczenia są konsekwentne i przedstawiają najważniejsze wyniki przedstawionej mi do oceny rozprawy.

W całym tekście rozprawy sugerowałbym umieszczać cytowania prac zaraz po pierwszym zdaniu przedawniającym osiągnięcia innych badaczy. Nie jest również powszechnie przyjętą praktyką zamieszczanie cytowań jak np: „Khalaf i wsp. opisali przypadek toksoplazmozy ośrodkowego układu nerwowego u 44-letniego pacjenta po przeszczepie szpiku kostnego, który był konieczny z powodu ostrej białaczki limfoblastycznej. Ze względu na pogarszający się stan zdrowia pacjenta wykonano szereg badań, w tym przyżyciową biopsję mózgu. W badaniu histopatologicznym uzyskanego materiału stwierdzono obecność bradyzoitów *T. gondii* (Khalaf i wsp. 2017).". Powinno być „**Khalaf i wsp. (2017)** opisali przypadek toksoplazmozy ośrodkowego układu nerwowego u 44-letniego pacjenta po przeszczepie szpiku kostnego, który był konieczny z powodu ostrej białaczki limfoblastycznej. Ze względu na pogarszający się stan zdrowia pacjenta wykonano szereg badań, w tym przyżyciową biopsję mózgu. W badaniu histopatologicznym uzyskanego materiału stwierdzono obecność bradyzoitów *T. gondii* ~~(Khalaf i wsp. 2017)~~.". Choć w innych miejscach cytowania bywają zamieszczane w sposób prawidłowy.

Autor nie uniknął błędów interpunkcyjnych i stylistycznych. Przykładem tego jest stawianie przecinka przed spójnikami takimi jak np. „lub". W co najmniej kilku miejscach znaleźć można zdania o złej konstrukcji, które mogą być niezrozumiałe lub ich brzmienie nie należy do poważnych

np: „Cook i wsp. w wyniku badań wieloośrodkowych kobiet ciężarnych stwierdzili, iż najistotniejszym czynnikiem ryzyka zarażenia się *T. gondii* w Europie była konsumpcja surowych lub długodojrzewajacych mięs i wędlin, w tym suszonego mięsa oraz salami (Cook i wsp. 2000).". Aż chce się doktorantowi zadać pytanie kim są te „wieloośrodkowe kobiety ciężarne". Rozumiem, że doktorantowi chodzi o badania wieloośrodkowe, przeprowadzone na grupie kobiet ciężarnych. Zdań tego rodzaju jest w rozprawie więcej, nie będę ich wszystkich wymieniał, szczególnie że z pewnością zostaną one poprawione w trakcie przygotowywania pracy do druku.

Po zapoznaniu się z treścią przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej, mogę stwierdzić, że została ona napisana w sposób prawidłowy. Doktorant sprecyzował i konsekwentnie zrealizował cele badawcze, stosując do tego odpowiednio dobraną metodykę. Wnioski końcowe wynikają z uzyskanych wyników i są jednoznaczne. Rozprawa napisana jest zrozumiałym językiem, a wiodący udział doktoranta nie budzi moich wątpliwości i świadczy o jego samodzielności naukowej. Zamieszczone w mojej recenzji uwagi i wątpliwości mają charakter konstruktywnej krytyki i nie obniżają mojej pozytywnej oceny pracy.

Podsumowując, przedstawiona mi do oceny rozprawa lek wet. Dawida Jańczaka pt. „Ocena zoonotycznych czynników ryzyka zarażenia człowieka pierwotniakiem *Toxoplasma gondii* na terenie Polski" jest dowodem umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Rozprawa ta spełnia warunki stawiane pracom doktorskim określone w ustawie o stopniach i tytule naukowym. Wnioskuję, więc do Wysokiej Rady NIZP-PZH o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie lek wet. Dawida Jańczaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz publicznej obrony rozprawy.

ADIUNKT
Katedra Biologii Ogólnej i Parazytologii
dr hab. Daniel Młocicki prof. IPPAN