

Dr hab. Krzysztof Tomczuk prof. nadzw. UP  
Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin 02. 08. 2018

## RECENZJA

dysertacji doktorskiej Pana lek. wet. Dawida Jańczaka

pt. „**Ocena zoonotycznych czynników ryzyka zarażenia człowieka pierwotniakiem**

***Toxoplasma gondii* na terenie Polski**”

wykonanej pod kierunkiem naukowym

dr hab. ELŻBIETY GOŁĄB prof. nadzw. NIZP-PZH

oraz dr n. med. WIOLETTY ROŻEJ-BIELICKIEJ

Zakład Parazytologii i Chorób Przenoszonych przez Wektory

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego-Państwowy Zakład Higieny w Warszawie

Toksoplazmoza jest jedną z najczęściej występujących inwazji pasożytniczych u ludzi i zwierząt. Jako zoonoza, z uwagi na jej oportunistyczny charakter, w wielu środowiskach społecznych budzi liczne kontrowersje. Niektórzy całkowicie bagatelizują jej znaczenie, nie znając skutków zarażenia tym pierwotniakiem. Inni wyolbrzymiają zagrożenie wzbudzając niepotrzebną panikę. Oba ekstremalne przypadki zachowań są konsekwencją niezrozumienia tematu lub braku wiedzy co do aktualnej sytuacji inwazyjologicznej. Z uwagi na małą patogenność pasożyta, inwazja ta stanowi zagrożenie wyłącznie dla wybranych grup żywicieli, zarówno zwierząt jak i ludzi. Przebieg zarażenia oraz konsekwencje kliniczne uzależnione są od sprawności układu immunologicznego. Dlatego ofiarami tego pasożyta są głównie osobniki niezdolne do właściwych reakcji immunologicznych. Stan taki wynikać może z faktu niedojrzałości immunologicznej – dotyczy to szczególnie płodów które w wyniku zarażenia mogą ulegać uszkodzeniu, lub bardzo młodych osobników. Odrębną grupę zagrożonych żywicieli stanowią ludzie z wtórnymi niedoborami immunologicznymi. Stany takie mogą być wynikiem chorób przebiegających z dysfunkcją układu

immunologicznego lub sztucznie utrzymywanej immunosupresji, szczególnie po transplantacjach. Odrębną grupę ryzyka stanowią osoby z zaburzeniami immunologicznymi wynikającymi z faktu starzenia się organizmów. W miarę rozwoju cywilizacji znacząco wzrasta liczba ludzi z wtórnymi dysfunkcjami immunologicznymi dla których toksoplazmoza może stanowić realne zagrożenie zdrowia a nawet życia. Dlatego badania uwarunkowań wpływających na ryzyko zarażenia ludzi i zwierząt pierwotniakiem *Toxoplasma gondii* są wyjątkowo cenne, poza aspektem poznawczym mają wyjątkowo ważny aspekt aplikacyjny, służąc w konsekwencji ochronie zdrowia publicznego. Mając to na uwadze, w mojej opinii wybór tematu pracy będącej podstawą dysertacji doktorskiej jest szczególnie trafny i w pełni uzasadniony.

Dysertacja doktorska napisana jest zgodnie z wymogami określonymi dla naukowych prac doświadczalnych, stanowiących przedmiot rozpraw doktorskich. Praca liczy 130 stron, w tym stronę tytułową, spis treści -3 strony, wykaz użytych skrótów -1 strona, obszerny wstęp liczący 22 strony, cel pracy-1 strona, materiał dotyczący badań – 9 stron, metody badań -10 stron, wyniki -21 stron, uzupełnione dokumentacją w postaci 3 wykresów, 7 tabel i 13 rycin przedstawiający rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR oraz trawienia enzymatycznego, dyskusja -24 strony, wnioski -1 strona, streszczenie w języku polski-3 strony, streszczenie w języku angielskim -3 strony, wykaz piśmiennictwa obejmujący 324 pozycji -25 stron, wykaz tabel -1 strona oraz wykaz rycin i wykresów -2 strony.

W obszernym wstępie, będącym syntetycznym kompendium aktualnego stanu wiedzy na temat toksoplazmozy, a jednocześnie stanowiącym teoretyczne uzasadnienie podjętych badań Doktorant omawia zagadnienia związane z inwazją *Toxoplasma gondii* u różnych żywicieli oraz konfrontuje podglądy na temat przyczyn i dynamiki szerzenia się tej pasożytozy u ludzi i zwierząt. W pierwszej części wstępu Autor prezentuje pozycję taksonomiczną pierwotniaka oraz opisuje szczegółowo, w oparciu o najnowsze piśmiennictwo światowe jego biologię i morfologię. Kolejna część tego rozdziału poświęcona jest omówieniu cyklu rozwojowego pierwotniaka z uwzględnieniem aspektów patogenezy inwazji oraz charakterystyki genetycznej pasożyta. Następnie autor szeroko omawia zagadnienia związane z inwazjologią *Toxoplasma gondii* analizując źródła i drogi szerzenia pierwotniaka oraz omawiając specyfikę przebiegu inwazji u różnych gatunków zwierząt w tym kotowatych, koni, małych i dużych przeżuwaczy, świń oraz zwierząt wolno żyjących. Szczególnie interesujące są dane dotyczące prewalencji inwazji u wielu gatunków zwierząt będących potencjalnym rezerwuarem pasożyta.

Wszystkie rozważania przedstawione we wstępie udokumentowane są odpowiednimi pozycjami piśmiennictwa. Oceniając tę część pracy, obiektywnie stwierdzam, że ujęte tu tezy i założenia stanowią gruntowne teoretyczne uzasadnienie badań będących przedmiotem dysertacji doktorskiej.

W następnej części pracy Autor przedstawia 3 cele badań którymi było:

- określenie częstości występowania przeciwciał IgG przeciwko *T. gondii* wśród wybranych zwierząt domowych, hodowlanych oraz w grupie praktykujących lekarzy weterynarii;
- określenie częstości występowania materiału genetycznego *T. gondii* w mleku owczym i kozim oraz w tkankach wybranych zwierząt hodowlanych i dziko żyjących;
- charakterystyka genetyczna szczepów *T. gondii* wyizolowanych od ludzi i zwierząt w latach 2006-2017.

W rozdziale „Materiał” Autor omawia różne rodzaje prób będących przedmiotem badań, w tym 349 prób kału kotów, 1160 prób surowicy krwi pochodzących od kotów, koni, owiec i kóz, 484 prób tkanek pochodzących od świń, bydła, owiec, kóz, zwierząt łownych, gryzoni i kotów, 118 prób mleka owiec i kóz oraz pochodzących od ludzi 151 prób surowicy krwi i 41 izolatów DNA *T. gondii*.

Rozdział „Metody” zawiera opisy wykonanych badań, będących przedmiotem dysertacji. Autor koncentrował się na trzech niezależnych kierunkach badań wykazujących obecność patogenów. Próby kału żywicieli ostatecznie oceniał metodami mikroskopowymi używając rozmazu bezpośredniego w tym niebarwionego oraz barwionego płynem Lugola oraz metody flotacji z użyciem soli kuchennej wg Fülleborna w modyfikacji wg Willisa. Próby surowicy badał przy użyciu komercyjnego testu ToxoScreen DA (bioMérieux SA, France) wykrywającego przeciwciała IgG anty-toksoplazma w surowicy metodą aglutynacji bezpośredniej. Analizy tkanek i mleka wykonał metodami molekularnymi z użyciem łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) oraz wewnętrznej łańcuchowej reakcji polimerazy (nested PCR). Analizowano niekodujący fragment DNA *T. gondii* wielkości 529 par zasad oraz gen B1 *T. gondii*. W reakcji (nested PCR) jako matrycę stosowano produkty PCR. W celu określenia przynależność poszczególnych izolatów *T. gondii* produkty nestedPCR poddawano trawieniu 9 enzymami restrykcyjnymi. Detekcję uzyskiwanych produktów amplifikacji i produktów trawienia enzymami restrykcyjnymi przeprowadzono na drodze elektroforezy w żelu agarozowym. Produkty reakcji nested PCR dla fragmentu kodującego

gen B1 *Toxoplasma gondii* poddano sekwencjonowaniu. Uzyskane sekwencje porównywano z sekwencjami banku genów (GenBank®).

Rozdział dotyczący metodyki, zamyka opis zastosowanych metod statystycznych. Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono w oparciu o testy statystyczne: Chi-kwadrat ( $\chi^2$ ), test Wilcoxon oraz test Cochran–Mantel–Haenszel. Modelowanie statystyczne przeprowadzono przy pomocy programu SAS 9.3, przyjmując za statystycznie istotne wartości  $p < 0,05$  przy poziomie ufności 95%.

Oceniając przedstawioną metodykę należy stwierdzić, iż w pracy zastosowano szeroki wachlarz nowoczesnych technik badawczych. Na uwagę zasługują szczególnie badania molekularne i serologiczne. Doktorant z dużą swobodą posługuje się nowoczesnymi technikami, co świadczy o szerokiej wiedzy i doświadczeniu, jak również umiejętności dobrania odpowiednich narzędzi niezbędnych do zrealizowania planów badawczych.

W rozdziale poświęconym wynikom pracy, Doktorant w sposób rzeczowy i zrozumiały przedstawia najistotniejsze z punktu widzenia prezentowanej rozprawy rezultaty badań. W badaniach koproskopowych oocysty *Toxoplasma gondii* stwierdził w próbce kału jednego kota - prewalencja 0,3% potwierdzając tezę o znikomym ryzyku bezpośredniego zarażenia od kotów. Przeciwciała IgG przeciw *T. gondii* wykryto w 92 (46%) próbach surowic kotów z Warszawy i okolic i 39,4% próbach surowic u zbadanych kotów z innych rejonów Polski. Odsetek zarażonych kotów wzrastał wraz z wiekiem. Ryzyko zarażenia *T. gondii* było wyższe wśród kotów żywionych surowym mięsem (szczególnie wieprzowiną), kotów polujących na drobne zwierzęta oraz bezdomnych. Wyniki te wskazują na powszechność inwazji u kotowatych przebiegającej z reguły bezobjawowo. Seroprewalencja inwazji *Toxoplasma gondii* wśród zwierząt gospodarskich wykazała zarażenie na poziomie 25% u owiec i 23% u kóz. Odsetek zarażonych kóz utrzymywanych pastwiskowo był istotnie wyższy niż kóz utrzymanych w systemie alkierzowym. U bydła i koni seroprewalencję inwazji stwierdzono na wyjątkowo niskim poziomie odpowiednio 1,8% i 0,4%. Analizę serologiczną dotyczącą ludzi przeprowadzono w oparciu o badanie surowic grupy zawodowej lekarzy weterynarii. Obecność przeciwciał wykazano u 26,5% badanych osób przy czym potwierdzono wzrost liczby zarażonych wraz z wiekiem badanych oraz u osób deklarujących spożywanie surowego mięsa. W badaniach genetycznych nie wykazano DNA *T. gondii* w próbach mięśnia sercowego kotów domowych. Natomiast fragment kodującego gen B1 *T. gondii* stwierdzono w 25% prób mięśni owiec, w 7,5% prób mleka owczego, 6,2% prób tkanek zwierząt łownych (głównie saren i dzików) oraz u jednego gryzonia. Na podstawie

analizy elektroforegramów stwierdzono, że uzyskane sekwencje fragmentu kodującego gen B1 należą do I oraz II lub III linii klonalnej *T.gondii*.

Opisowa część wyników badań została uzupełniona o liczne przejrzyste ryciny i tabele, które wzbogacają dysertację i ułatwiają porównania uzyskanych przez Doktoranta wyników.

W rozdziale „Dyskusja” Doktorant jasno i wyczerpująco porównuje wyniki własnych badań z wynikami cytowanymi w bogatym i trafnie dobranym piśmiennictwie. Autor ocenił rozpowszechnienie zarażenia *Toxoplasma gondii* u kotów oraz wśród zwierząt hodowlanych i wolno żyjących. Szczególnie ciekawym okazało się zestawienie wyników dotyczących występowania *Toxoplasma gondii* wśród praktykujących lekarzy weterynarii w porównaniu do ogólnej prevalencji inwazji w społeczeństwie. Dane te ewidentnie wykluczają bezpośredni kontakt ze zwierzęciem jako zwiększone ryzyko zarażenia toksoplazmozą. Szczególnie interesujące są zestawienia wyników badania genetycznego izolatów wykazujące różnicowanie linii klonalnych oraz wykazujące znaczny udział w próbach zwierzęcych wysoce patogennej linii klonalnej I. Na uwagę i uznanie zasługuje także wykrycie po raz pierwszy w Polsce tej linii klonalnej u ludzi. Doktorant porównując własne wyniki z wynikami dostępnymi w licznie cytowanej literaturze udowadnia dobrą znajomość problematyki, a także umiejętność przedstawienia nowych wniosków, w zwartej i logicznej formie. Jest otwarty w formułowaniu logicznych wniosków, wynikających z przeprowadzonych badań. Omawiana dyskusja wzbogaca wartość pracy i świadczy o dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktoranta.

Na podstawie przeprowadzonych badań, Autor pracy wysunął 4 interesujące wnioski, związane z kolejnymi etapami badań. Wszystkie odnoszą się zasadniczo do problematyki zawartej w celach badań i znajdują swe uzasadnienie w uzyskanych wynikach doświadczenia.

Pracę oceniam bardzo wysoko, szczególnie za umiejętność połączenia w niej wyników badań podstawowych i aplikacyjnych. Nie wnoszę żadnych zastrzeżeń do wartości merytorycznej pracy. Dysertacja jest napisana w sposób zrozumiały, a konstrukcja manuskryptu jest przejrzysta.

Z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę na niewielkie nieścisłości językowe i redakcyjne dostrzeżone w pracy np.

Str. 8. wers 8-9 : w zdaniu ”-który może przebiegać w formie płciowej w przewodzie pokarmowym żywicieli ostatecznych, czyli ssaków z rodziny kotowatych (*Felidae*), lub w formie bezpłciowej w tkankach stałocieplnych kręgowców będących żywicielami

przypadkowymi, .... -,, U żywiciela ostatecznego w inwazji *Toxoplasma gondii* poza rozwojem płciowym zachodzi również rozwój bezpłciowy (schizogonia poprzedza gamogonię), natomiast określenie żywicieli przypadkowych proponuje zastąpić żywicielami pośrednimi – których spektrum jest bardzo szerokie .

Str 11. wiersz 13-15: w zdaniu „*Toxoplasma gondii* występuje w trzech zasadniczych formach rozwojowych: tachyzoitu, cysty tkankowej wypełnionej bradyzoitami oraz oocyty... W mojej opinii autor porównuje formy komórkowe (troficzne) pierwotniaka do postaci „organizacyjnych” – Postaciami komórkowymi byłyby zatem tachyzoity, bradyzoity oraz sporozoity zlokalizowane odpowiednio w pseudocystach, cystach tkankowych oraz oocytach. Autor nie używa pojęcia pseudocysty mimo obecności tego określenia w literaturze parazytologicznej.

Str 14 wiersz 5-6 : w zdaniu „*Cykl płciowy T. gondii, zwany sporogonią, ma miejsce w komórkach nabłonka jelita cienkiego żywicieli ostatecznych,.....*” Jest to błędne sformułowanie : Cykl płciowy w rozwoju *Toxoplasma gondii* obejmuje 3 fazy – gamogonię – etap formowania się gamet, gametogonię – faza zapłodnienia, oraz sporogonię – podział redukcyjny zygoty w wyniku którego powstają sporozoity. Jest to przykład mejozy postgamicznej która zachodzi u wszystkich pierwotniaków należących do typu Apicomplexa. W przypadku *Toxoplasma* pierwsze dwie fazy odbywają się wewnątrzkomórkowo w obrębie enterocytów kota natomiast sporogonia ma miejsce w środowisku zewnętrznym. Ta sama uwaga odnosi się do zdania na str 15 wiersz 1-3

Str 15 wiersz 8-9: w zdaniu „*Cykl bezpłciowy toksoplazmy odbywa się zarówno w komórkach żywicieli pośrednich jak i pozajelitowo u żywicieli ostatecznych.*” Pozajelitowy – rozwój bezpłciowy w cyklu *Toxoplasma gondii* jest typowy dla żywiciela pośredniego. Fakt że potwierdzono jego występowanie u kota powoduje, że kotowate w cyklu mogą odgrywać podwójną rolę: występować jako jedyni żywiele ostateczni oraz jako jedni z wielu gatunków żywicieli pośrednich.

Powyższe uwagi nie umniejszają wartości naukowej ocenianej dysertacji, mają głównie charakter uwag redakcyjnych, z nadzieją, że zostaną uwzględnione przed przekazaniem wyników pracy do publikowania.

Końcowa ocena pracy

Pracę doktorską Pana lek. wet. Dawida Jańczaka oceniam bardzo wysoko. Doktorant w pełni zrealizował postawione w założeniach pracy cele i wysunął trafne wnioski. Włożył wiele wysiłku w opracowanie strony graficznej pracy, podnoszącej wartość merytoryczną pracy doktorskiej. Zarówno dobór metod badawczych jak też interpretacja wyników badań

własnych, w konfrontacji z licznie cytowanymi pracami innych autorów, świadczą o dojrzałości naukowej Autora. Rozprawa doktorska Pana lek. wet. Dawida Jańczaka wnosi nowe, oryginalne wartości poznawcze i poszerza wiedzę na temat możliwych dróg szerzenia się toksoplazmozy zwierząt oraz człowieka. Jest to oryginalne opracowanie autorskie, które w dobie dynamicznego rozprzestrzeniania się tej parazytozy zasługuje na docenienie i powinno być szeroko nagłośnione. Z uwagi na zoonotyczny charakter inwazji, wyniki badań będących podstawą pracy doktorskiej Pana lek. wet. Dawida Jańczaka, z pewnością zainteresują również odpowiednie służby sanitarne.

Przedstawiona do oceny praca jest samodzielnym, oryginalnym i wartościowym dorobkiem naukowym Pana lek. wet. Dawida Jańczaka, o dużych wartościach naukowo-poznawczych, a szczególnie aplikacyjnych i 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. Biorąc powyższe pod uwagę, przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny w Warszawie wniosek, o dopuszczenie Pana lek. wet. Dawida Jańczaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wysoka ocena pracy, uwzględniająca przede wszystkim aktualność tematu problematyki badawczej, szeroki zakres oraz rzetelność badań, upoważnia mnie do wystąpienia z wnioskiem o jej wyróżnienie oraz przedstawienie w stosownym czasie jej Autora do nagrody.

Dr hab. Krzysztof Tomczuk  
prof. nadzwyczajny UP w Lublinie

