



WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY ŚRODOWISKA
Uniwersytet Łódzki

Łódź, 31 lipca 2018 r.

Prof. dr hab. Henryka Długońska
Zakład Immunoparazytologii
Uniwersytetu Łódzkiego

OCENA

rozprawy doktorskiej lek. wet. Bartosza Dominiaka-Górskiego pt. „Oszacowanie występowania przeciwciał przeciwko *Toxoplasma gondii* u zwierząt gospodarskich i towarzyszących jako potencjalnego źródła zarażenia ludzi”

Przegląd piśmiennictwa wskazuje, że pasożytniczy pierwotniak *Toxoplasma gondii* i wywoływana przez niego choroba – toksoplazmoza – stanowią od ponad 100 lat przedmiot intensywnej badań nie tylko parazytologów, ale także przedstawicieli innych dyscyplin naukowych. To duże zainteresowanie wynika z bardzo ciekawej biologii pasożyta, jego znaczenia medycznego i weterynaryjnego oraz faktu, iż służy on jako organizm modelowy do badań nad pokrewnymi pasożytami. Inwazje *T. gondii* są kosmopolityczne i powszechne u zwierząt stałocieplnych i człowieka, a ich skutki mają poważny wymiar ekonomiczny i humanitarny. Poza stosunkowo rzadkim zarażeniem wrodzonym (odmatczynym), laboratoryjnym lub jatrogennym związanym z zabiegami medycznymi (transfuzje czy przeszczepianie tkanek i organów), wszystkie pozostałe przypadki toksoplazmozy nabywane są drogą pokarmową poprzez cysty tkankowe *T. gondii* lub oocysty, będące produktem cyklu płciowego pasożyta przebiegającego u kotowatych (w tym kota domowego) jako żywicieli ostatecznych tego pasożyta. Przeglądy seroepidemiologiczne różnych populacji ludzkich i zwierzęcych, polegające na poszukiwaniu swoistych przeciwciał przeciwko *T. gondii* u

badanych żywicieli pośrednich i ostatecznych, mają z reguły charakter wycinkowy i przynoszą fragmentaryczne dane, które trudno zinterpretować w sposób całościowy. Dlatego też podjęta w niniejszej pracy próba określenia częstości występowania swoistych przeciwciał anty-*T. gondii* u wybranych gatunków zwierząt gospodarskich i towarzyszących człowiekowi jest uzasadniona ze względów poznawczych i epidemiologicznych. Warto odnotować istotną uwagę, że wykrycie swoistych przeciwciał anty-*T. gondii* jest tylko świadectwem zarażenia i wytworzenia nabytej odporności, czemu nie zawsze towarzyszy obecność żywego pasożyta w danym organizmie. W badaniach seroepidemiologicznych wykrycie swoistych przeciwciał jest powszechnie uznawane za potwierdzenie zarażenia.

Przedłożona mi do recenzji praca obejmuje 184 strony tekstu, podzielonego na rozdziały w sposób typowy dla rozpraw doktorskich doświadczalnych: wstęp, cel pracy i hipoteza badawcza, materiały i metody, wyniki wraz z analizą statystyczną, dyskusja i piśmiennictwo. Na końcu pracy umieszczono załączniki oraz spis rycin i tabel. Na obszerną część dokumentacyjną pracy składa się łącznie 40 rycin i 57 tabel. Osiemnaście spośród tych tabel znajduje się w rozdziale Załączniki i przedstawia surowe wyniki oznaczenia wartości absorbancji w pojedynczych próbkach surowicy badanych zwierząt.

Wstęp (rozdział 1.) jest napisany w sposób kompetentny i uporządkowany. Stanowi rzeczowe wprowadzenie do zaplanowanych badań oraz uzasadnia ich celowość. Poruszono w nim różnorodne zagadnienia, w tym historię odkrycia *T. gondii* i toksoplazmozy, pozycję taksonomiczną tego pasożyta, jego budowę i cykl rozwojowy oraz strukturę populacyjną i antygenową. Opisano także toksoplazmozę u człowieka i zwierząt, a także metody diagnostyki tej parazytozy.

Cel pracy (rozdział 2.1.). Przy formułowaniu celu pracy wzięto pod uwagę dwie przesłanki: 1/ toksoplazmoza u ludzi jest z reguły chorobą odzwierzęcą oraz 2/ wskaźnikiem zarażenia *T. gondii* są swoiste przeciwciała przeciw temu pasożytowi. Biorąc pod uwagę te dwie przesłanki postanowiono w niniejszej pracy określić częstość występowania przeciwciał IgG anty-*T. gondii* u 4 gatunków zwierząt gospodarskich i kota domowego i na tej podstawie ocenić potencjalne ryzyko zarażenia dla człowieka.

Rozdział 3. Materiały i metody. Badania zostały wykonane na surowicach krwi otrzymanych od zwierząt gospodarskich: świń, bydła domowego, owiec i koni (żywicieli pośrednich *T. gondii*) oraz kotów domowych, żywicieli ostatecznych tego pasożyta. Surowice

ww. zwierząt były przekazane przez Zakład Higieny Weterynaryjnej w Gdańsku, Państwowy Instytut Weterynarii w Puławach i gabinet weterynaryjny w Gdańsku. Scharakteryzowano je, podając miejsce i rok pobrania, wiek i płeć zwierząt oraz wielkość stada. Metodę badań, bazującą na dwóch metodach serologicznych (MAT i ELISA) wykrywających przeciwciała klasy IgG przeciw *T. gondii*, przedstawiono szczegółowo, ale w opisie metody ELISA nie znalazłam informacji, w ilu studzienkach mikro płytki była oznaczana pojedyncza próbka i czy oznaczenie powtarzano.

Wyniki (rozdział 4). W części wstępnej badań wyselekcjonowano grupę surowic *T. gondii*-dodatnich i *T. gondii*-ujemnych przy użyciu komercyjnego, zmodyfikowanego testu aglutynacji bezpośredniej (MAT). Surowice te posłużyły następnie do wyznaczenia rozcieńczeń odczynników (w tym surowic kontrolnych i badanych oraz przeciwciał drugorzędowych) używanych w głównym, przesiewowym teście tj. pośrednim odczynie ELISA, z zastosowaniem naturalnego poliwalentnego preparatu TLA (*Toxoplasma* Lysate Antigen) jako antygeny diagnostycznego. Dla surowic każdego z gatunków zwierząt określono w teście IgG-ELISA wartość współczynnika cut-off, na podstawie którego klasyfikowano badane surowice jako *T. gondii*-dodatnie albo *T. gondii*-ujemne. Tok postępowania w badaniach wstępnych, zmierzających do ustalenia warunków prowadzenia przeglądu seroepidemiologicznego metodą ELISA, uważam za prawidłowy. Dla każdej próbki surowic badanych obliczono wartość absorbancji właściwej (po odliczeniu wartości cut-off), a uzyskane wyniki przedstawiono po opracowaniu w tabelach rozdziału 4. i zilustrowano na rycinach, a następnie poddano analizie statystycznej, opisanej w rozdziale 5.

Ogółem przebadano 8137 zwierząt: wśród nich bydło stanowiło 51,6%, owce 22,2%, świnie 21,6%, konie 2,3% i koty 1,3%. Pula uzyskanych w pracy wyników jest bardzo obfita, a ich szczegółowy opis pod tabelami i rycinami nie budzi moich zastrzeżeń. Podsumuję więc tylko najistotniejsze rezultaty badań Autora.

1/ Wartością podjętych badań jest ich szeroki zakres. Badania wykonano na populacji złożonej z 8137 zwierząt, należących do 5 gatunków bytujących w otoczeniu człowieka. Do badań użyto, co jest raczej wyjątkiem w przypadku zwierząt, niekomercyjnego testu pośredniego testu ELISA jako testu przesiewowego. Surowice pochodziły od zwierząt z różnych miejscowości, powiatów lub nawet województw Polski (jak w przypadku świń), co

uprawniało Doktoranta do wiarygodnego skomentowania wyników i wysunięcia wniosków ogólnych.

2/ Zaobserwowano zróżnicowaną częstość zarażenia badanych zwierząt *T. gondii*: najwyższą u owiec (55,3%), niższą u kotów (32%), koni (20,9%), świń (19,2%) i najniższą u bydła (3,1%). Prewalencja zarażenia wykazywała tendencję wzrostową wraz z wiekiem badanych zwierząt i była zależna od miejsca pochodzenia zwierząt i wielkości hodowli.

3/ Po wykonaniu analizy statystycznej wyników stwierdzono istnienie statystycznie istotnych różnic ($p < 0,001$) między grupami zwierząt. Dotyczą one częstości występowania wyników dodatnich i ujemnych. Tylko w grupie surowic owiec wynik dodatni występuje częściej niż wynik ujemny, w pozostałych grupach surowic – wynik dodatni występuje rzadziej niż ujemny. Różnica w częstości wyników dodatnich wynosi aż 53%. Wykazano ponadto statystycznie istotne ($p < 0,001$) różnice między wartościami absorbancji surowic w poszczególnych grupach zwierząt. Najwyższą średnią wartość absorbancji stwierdzono w przypadku surowic owczych ($0,60 \pm 0,32$), a najniższą – surowic bydłowych ($0,19 \pm 0,06$).

Rozdział 6. **Dyskusja** jest podzielony na 6 monotematycznych podrozdziałów. W podrozdziale 6.1 poddano ocenie wartość różnych metod laboratoryjnej diagnostyki toksoplazmozy, a wśród nich metod serologicznych, które chociaż obarczone wadami są najczęściej stosowane w badaniach naukowych i rutynowych. Szczególną uwagę poświęcono dwóm metodom wykorzystanym w niniejszej pracy, a mianowicie MAT i ELISA. Podrozdział 6.2 to przegląd literatury światowej nt. roli zwierząt w transmisji zarażenia *T. gondii* na człowieka. W podrozdziale 6.3 skonfrontowano wyniki własne otrzymane testem ELISA z danymi literaturowymi, rozważając znaczenie potencjalnych czynników determinujących zróżnicowane rezultaty przeglądów epidemiologicznych, takie jak rodzaj hodowli, wielkość stada, warunki zoohigieniczne i stosowanie zasad bioasekuracji. Analizując w podrozdziale 6.4 wartość metod serologicznych poświęcono szczególną uwagę antygenom rekombinowanym, które stanowią obecnie dużą szansę ulepszenia metod diagnostycznych, łącznie z możliwością różnicowania fazy ostrej i przewlekłej toksoplazmozy. W podrozdziale 6.5 opisano i skomentowano metody profilaktyki ekspozycyjnej i immunoprofilaktyki toksoplazmozy. Mogą się one przyczynić do zmniejszenia liczby nowych przypadków tej pasożytozy i częstości zarażenia *T. gondii* zarówno u człowieka, jak zwierząt, które są rezerwuarem pasożyta. Podsumowano dyskusję w końcowym podrozdziale (6.6), postulując

m.in. wprowadzenie badań przesiewowych wśród zwierząt hodowanych na cele konsumpcyjne, już na etapie hodowli i być może przy użyciu antygenów rekombinowanych jako antygenów diagnostycznych do testu ELISA.

Lektura rozdziału Dyskusja jest pouczająca ze względu na wielostronną, wnikliwą i wyczerpującą analizę uzyskanych w pracy wyników w świetle licznych i ciekawych danych literaturowych, a ponadto dociekliwość, rzetelność naukową i krytycyzm Autora.

Piśmiennictwo (rozdział 7.) obejmuje 207 pozycji w języku angielskim i polskim, głównie z ostatnich 10-15 lat, ale z uwzględnieniem znaczących wcześniejszych publikacji. Autor wyselekcjonował je i zastosował w tekście pracy prawidłowo. Zapis literatury jest jednak w wielu przypadkach niekonsekwentny: wielkie i małe litery zaczynające kolejne słowa w nazwach czasopism (np. nr 17.), nazwy zapisane w pełnym brzmieniu lub skrótami (np. nr 15.) albo wręcz brak pełnych wymaganych informacji (np. nr 195.).

W ocenie strony formalnej rozprawy stwierdzam, że praca ma prawidłową strukturę i jest napisana dość poprawnym językiem, chociaż jej poszczególne części są zróżnicowane pod tym względem. Moje zastrzeżenia budzi sformułowanie niektórych tytułów, np. „Porównanie grup zwierząt pod względem występowania ekstynkcji (podrozdział 5.3) czy „..... nasilenia ekstynkcji” (podrozdział 5.4). Akronim ESA (Excreted/Secreted Antigens) na str. 6. oznacza antygeny wydalniczo-wydzielnicze, a nie wydzielniczo-sekrecyjne. Podobnie, na tej samej stronie, pod skrótowcem ISAGA (Immunosorbent Agglutination Assay) kryje się test aglutynacji immunoadsorpcyjnej, a nie immunoabsorbcyjnej. Dalej, „bioptaty tkanki mózgowej” (str.41), zamiast nerwowej, „Merkaptoetanol wiąże przeciwciała IgM” (str. 68), zamiast inaktywuje przeciwciała IgM, redukując mostki disiarczkowe do wiązań –SH. Brak precyzji w sformułowaniu niektórych zdań wypacza ich sens, np. na str. 83: „Dzięki przeprowadzonym badaniom stwierdzono, że poziom swoistych przeciwciał w poszczególnych stadach wynosi >50%”, podczas gdy chodzi nie o poziom, a o odsetek zwierząt serododatnich (czyli częstość występowania przeciwciał podaną w procentach) itd. Czasem podana informacja jest zbyt uproszczona, jak np. na str. 127. „szczepem T-263, który wytwarza tylko jedną gametę”, zamiast wytwarza tylko jeden rodzaj gamet, męskich albo żeńskich. W tekście pracy jest też dużo błędów gramatycznych typu pomyłone przypadki i rodzaje rzeczowników oraz błędów literowych, co świadczy o niestarannej korekcie

autorskiej. Zdaję sobie sprawę, że trudno przygotować tekst poprawny pod względem merytorycznym i gramatycznym, ale niewątpliwie liczne usterki językowe i edytorskie przeszkadzają w prawidłowej percepcji pracy i niepotrzebnie rozpraszają czytającego.

Podsumowując, recenzowana praca doktorska wnosi do literatury przedmiotu nową i obszerną wiedzę nt. rozprzestrzenienia pasożyta *T. gondii* w wybranych populacjach zwierząt gospodarskich takich jak świnie, owce, bydło i konie oraz u kotów domowych. Uzyskane wyniki powinny stać się przedmiotem analizy przez stosowne służby weterynaryjne i medyczne. Autor wykazał bowiem, że badane gatunki zwierząt stanowią realne, chociaż zróżnicowane gatunkowo, zagrożenie epidemiologiczne dla ludzi i zwierząt. Toksoplazmoza jest chorobą zaniedbaną, ponieważ rzadko przebiega symptomatycznie i powoduje śmierć, jednakże długotrwała obecność pasożyta, zwłaszcza w mózgowiu, stanowi tlące się zarzewie ognia, który wybucha w stanie, choćby przejściowej, immunosupresji w organizmie żywiciela. Ponadto, pasożyt zamknięty w cystach tkankowych wytwarza liczne cząsteczki efektowe, które zmieniają chemizm mózgowia i naruszają szlaki neurotransmisyjne, a przez to zmieniają zachowanie człowieka (i zwierząt) i mogą być potencjalną przyczyną chorób o podłożu nerwowym, takich jak np. schizofrenia, depresja czy choroba Parkinsona.

Wniosek końcowy: omawiana praca może z powodzeniem stanowić podstawę starań jej Autora o uzyskanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych, w dyscyplinie medycyna. Z pełnym przekonaniem przedkładam więc Radzie Wydziału Nauk o Zdrowiu GUM mój wniosek o dopuszczenie Pana Bartosza Dominiaka-Górskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Zakład Immunoparazytologii
w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej UŁ
Henryka Długońska
prof. dr hab. Henryka Długońska