

Puławy, 10 sierpnia 2018 r.

Dr hab. Tomasz Cencek, prof. nadzw.  
Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych  
Państwowego Instytutu Weterynaryjnego  
-Państwowego Instytutu Badawczego  
w Puławach

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej lek. wet. Bartosza Dominiaka-Górskiego pt.: „Oszacowanie występowania przeciwciał przeciwko *Toxoplasma gondii* u zwierząt gospodarskich i towarzyszących jako potencjalnego źródła zarażenia ludzi”, wykonanej pod kierunkiem dr. hab. med Joanny Stańczak prof. nadzw. oraz dr hab. inż. Lucyny Holec-Gąsior. Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi uchwała Rady Wydziału Nauk o Zdrowiu Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z dnia 21.06.2018 r..

*Toxoplasma gondii* to pasożytniczy pierwotniak, jedyny gatunek w obrębie rodzaju *Toxoplasma*. Należy on do typu Apicomplexa gromady Coccidea. W cyklu rozwojowym tego pasożyta występuje zarówno żywiciel ostateczny jak i żywiciel pośredni. Żywicielem ostatecznym są koty i inne gatunki z rodziny Felidae. U zwierząt tych w nabłonku jelit dochodzi do rozmnażania płciowego, którego rezultatem jest wytworzenie form dyspersyjnych – oocyst. Oocysty wydalane z kałem najczęściej młodych, zarażonych osobników sporulują w środowisku zewnętrznym osiągając stadium inwazyjne. Sporulowanymi oocystami zarażają się żywiele pośredni, którymi mogą być różne gatunki ssaków i ptaków. Przypadkowym żywicielem pośrednim jest również człowiek. U żywicieli pośrednich pasożyty rozmnażają się bezpłciowo, tworząc w tkankach cysty wypełnione licznymi komórkami potomnymi – bradyzoitami. Takie tkanki mogą stanowić źródło zarażenia dla kolejnych żywicieli ostatecznych, ale również dla żywicieli pośrednich. Zараżanie się cystami tkankowymi jest najprawdopodobniej główną drogą zarażenia się ludzi. Możliwe jest również zarażenie drogą pionową – przez łożysko. Ta droga jest szczególnie niebezpieczna, gdyż często prowadzi do ronień lub tzw. toksoplazmozy wrodzonej u płodów. Ciężkie objawy towarzyszące tej postaci toksoplazmozy sprawiają, że jest ona w centrum uwagi licznych ośrodków naukowych medycznych i weterynaryjnych jak i praktykujących położników.

Należy tu zaznaczyć, że liczne możliwe drogi zarażenia się toksoplazmami sprawiły, że pasożyt ten jest jednym z najpowszechniej występujących u zwierząt stałocieplnych, a unikanie zarażenia się przez ludzi bardzo trudne.

Praca lek. wet. Bartosza Dominiak-Górskiego ma właśnie na celu określenie zagrożenia transmisji tego pasożyta od zwierząt gospodarskich i towarzyszących na ludzi. Doktorant

w tym celu postanowił oszacować częstość występowania przeciwciał dla *T. gondii* w surowicach 5 gatunków zwierząt: kotów, bydła, koni, owiec i świń w Polsce. Wybór tematyki pracy jest w mojej opinii trafny i w pełni uzasadniony.

Oceniana dysertacja ma częściowo układ typowy dla tego rodzaju opracowań. Składają się na nią bowiem: Wstęp, Cel pracy i hipoteza badawcza, Materiał i metody, Wyniki, Analiza statystyczna otrzymanych wyników i Dyskusja. Części te poprzedzone są Spisem treści, Streszczeniem i Wykazem stosowanych skrótów, a po nich Autor umieścił wykaz piśmiennictwa, rozdział zatytułowany Załączniki, w którym zawarł tabele 8.1-8.19 będące zapisem wyników badań serologicznych testem ELISA, i dwa spisy – Spis rycin i Spis tabel. Brak jest w stosunku do typowego układu tego typu prac rozdziału Wnioski, które tylko częściowo zastępuje podrozdział „Podsumowanie” w Dyskusji.

Rozprawa liczy w sumie 184 ponumerowane strony wydruku komputerowego. Zawiera 57 tabel i 40 rycin. Wykaz piśmiennictwa obejmuje 207 pozycji. Praca przygotowana jest w sposób niezwykle estetyczny. Wprowadzona numeracja rozdziałów i licznych podrozdziałów umożliwia łatwe odszukanie konkretnego fragmentu pracy. Tabele przedstawione są w sposób przejrzysty, a bardzo liczne ryciny wykonane są starannie, choć nie są pozbawione błędów, o czym w dalszych częściach recenzji. Zamieszczenie w osobnym rozdziale „Załączniki” tabel będących rejestracją uzyskanych wyników uważam za dobry pomysł. Tabele te w większości mają dużą objętość i zamieszczone w tekście pracy utrudniałyby niepotrzebnie jej odbiór. Zastosowana ich lokalizacja, nie zaburzając układu graficznego pracy, umożliwia natomiast dociekliwemu czytelnikowi samodzielną analizę wyników.

Wstęp zawarty na 45 stronach wydruku stanowi wprowadzenie w problematykę toksoplazmozy. Autor przedstawił w wyczerpujący sposób „ogólną charakterystykę *Toxoplasma gondii*” tj. miejsce pasożyta w systematyce, jego morfologię, cykl rozwojowy, rozprzestrzenienie na świecie, historię badań nad tym pasożytem, w skrócie genetykę pasożyta (w tym spotykane typy klonalne). Dużo uwagi Doktorant poświęcił toksoplazmozie - jednostce chorobowej, której przyczyną, jest *T. gondii* zarówno u ludzi jak i u zwierząt. Pod tym kątem omówił również mechanizmy obronne towarzyszące inwazji *T. gondii* oraz antygeny pasożyta. To z kolei było podstawą do dalszych dywagacji na temat diagnostyki (w tym diagnostyki serologicznej) toksoplazmozy. W moim odczuciu Wstęp świadczy o swobodnym poruszaniu się lek wet Bartosza Dominiak-Górskiego w tematyce toksoplazmozy i dobrej znajomości piśmiennictwa polskiego jak i obcego w tej dziedzinie. Według mnie wstęp jest jednym z silniejszych elementów pracy Doktoranta i po uwzględnieniu uwag, które podam w dalszej

części recenzji może być z pewnością opublikowany jako dobra, samodzielna praca przeglądowa.

Rozdział Cel pracy i hipoteza badawcza jasno precyzuje intencje Autora tj. „oszacowanie występowania swoistych przeciwciał przeciwko *Toxoplasma gondii* w surowicy pięciu gatunków zwierząt”. „Ocena potencjalnego ryzyka zarażenia tym pasożytem” jest już jednak częścią, która raczej wynika z dyskusji, niż bezpośrednio z wyników przeprowadzonych badań. Natomiast kolejny „cel” (podany w trybie dokonanym) przeanalizowanie metod diagnostycznych, opisuje jedynie fragmenty zawarte głównie we wstępie i częściowo w dyskusji. Moim zdaniem należy rozdział „Cel pracy i hipoteza badawcza” ograniczyć jedynie do pierwszego celu, a jako, że praca w dużej mierze ma charakter rejestracyjny, zrezygnować również z hipotezy badawczej.

Kolejny rozdział – Materiał i metody liczy 13 stron. W części tej Doktorant podał miejsca pozyskania surowic do badań, scharakteryzował populacje zwierząt od których pobierano krew. Dane te przedstawił w osobnych podrozdziałach osobno dla każdego gatunku badanych zwierząt. Wydaje się, że w tej części Autor, kierowany zapewne troską o bardzo przejrzyste przedstawienie informacji nieco w tej dbałości przesadził. W mojej opinii np. zamieszczanie rycin ilustrujących dane podane w tekście i dotyczące przykładowo stosunku płci, czy też dokładne powtarzanie na mapach informacji również zawartych w tekście i dotyczących liczby próbek pozyskanych z poszczególnych województw jest niepotrzebne. Takie dane (mapy) były by niewątpliwie cenne dla odbiorcy zagranicznego i można rozważyć ich zamieszczenie w przyszłych publikacjach. Dalej opisał metody serologiczne, którymi badał pozyskane surowice – komercyjny test Toxo-screen DA firmy bioMerieux oraz własny test ELISA do którego Autor wykorzystał poliwalentny antygen natywny (TLA) otrzymany z Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej. Jako, że zastosowanie tego antygenu jest pewnym novum, szkoda, że Doktorant nie pokusił się o nieco dokładniejszą charakterystykę tego antygenu jak choćby zawartość białek w tym antygenie, profil białkowy itp.

Rozdział Wyniki zawarty został na 29 stronach wydruku. Podobnie jak poprzedni rozdział, ten też został podzielony przez Doktoranta na liczne podrozdziały i w zasadniczej swojej części (wyniki badania testem ELISA) podrozdziały te odpowiadają gatunkom badanych zwierząt. Rozpoczyna jednak Autor rozdział Wyniki od rezultatów uzyskanych testem MAT. Poprzedza tę część wstępem, w którym omawia zasadę i charakterystykę testu. Wydaje się, że informacje takie powinny raczej znaleźć się we wstępie.

Istotną informacją jest na pewno cel jaki przyświecał Doktorantowi w przeprowadzeniu tych badań – wstępne wyselekcjonowanie za pomocą testu MAT surowic pozytywnych i negatywnych owiec, kotów i koni do późniejszego „zwalidowania” testu ELISA dla gatunków, dla których nie udało się pozyskać surowic kontrolnych inną drogą. Jak wskazują uzyskane rezultaty, udało się zakładany cel zrealizować. Doktorant wyselekcjonował 22 dodatnie i 23 ujemne surowice kocie, 78 dodatnich i 37 ujemnych surowic owczych, 22 dodatnie i 63 ujemnych surowic końskich.

Następnie lek. wet. Bartosz Dominiak-Górski przeszedł w pracy do wyników badań surowic testem ELISA podając ogólnie liczbę i odsetek wyników dodatnich uzyskanych w teście dla każdego gatunku zwierząt, a dopiero potem wyniki, jak to nazwał, miareczkowania testu i wyznaczenia współczynników granicznej wartości absorbancji, po czym szczegółowo omówił już uzyskane wyniki badań epidemiologicznych dla każdego gatunku zwierząt. W moim mniemaniu taki układ wprowadza pewne zamieszanie w odbiorze pracy i przy publikowaniu wyników radził bym zrezygnować z ogólnego podania wyników wszystkich gatunków, rozpoczynając tę część pracy od wyników miareczkowania. Pewne uwagi mam do części dotyczącej wyznaczenia współczynnika cut-off. Po pierwsze wydaje mi się, że sposób wyznaczenia tego współczynnika powinien być opisany w rozdziale „Materiał i metody”. Po drugie, jakkolwiek sposób wyznaczania tego współczynnika zastosowany przez Doktoranta z zastosowaniem jedynie wyników pewnych surowic ujemnych, obliczaniem średniej ekstynkcji i odchylenia standardowego jest wymieniany w literaturze fachowej, to jednak należy podkreślić, że jest to sposób bardzo mało precyzyjny i wymaga on przeprowadzenia dodatkowych obliczeń (np. potwierdzenia rozkładu normalnego badanej cechy w populacji). Wartość tak wyznaczonej wartości granicznej mogła by być oceniona np. przez określenie w procesie walidacyjnym współczynników odtwarzalności, czy powtarzalności

Mając wytypowane pule surowic ujemnych i dodatnich można było pokusić się o przeprowadzenie analizy krzywych ROC (Receiver Operating Characteristic) lub co najmniej o przeprowadzenie (podobnej jak przeprowadzona dla surowic ujemnych) analizy dla pul surowic dodatnich i wyznaczenie przedziałów dla surowic wątpliwych.

Wybrany przez Doktoranta sposób wyznaczenia współczynnika cut-off sprawia, że analizy dotyczące liczby seroreagentów dodatnich i ujemnych są niewątpliwie łatwiejsze. Należy jednak mieć świadomość występującego błędu - poniżej granicznego współczynnika absorbancji umiejscawiają się wyniki surowic ujemnych (95% takich wyników- jeżeli rozkład cechy był rozkładem normalnym) i pewnej części surowic dodatnich. Oczywiście akceptacja

takego błędu w wynikach jest prerogatywą Wykonawcy badań lecz powinno to być zaznaczone w pracy i w dalszej jej części przedyskutowane.

Wyniki bowiem lek. wet. Bartosz Dominiak-Górski uzyskał bardzo ciekawe. Na niespotykane dużym materiale określił częstość występowania swoistych dla *T. gondii* przeciwciał u gatunków, o bardzo dużym potencjale zoonotycznym. Stwierdził występowanie tych przeciwciał u 32% kotów, 19,2% świń, 3,1% bydła, 55,3% owiec i 20,9% koni. Doktorant przeanalizował występowanie przeciwciał u samców i samic, zwierząt w różnych grupach wiekowych i różnym sposobie utrzymania. Stwierdził na przykład, że u kotów bezdomnych i kotów wychodzących z domów odsetek zwierząt serologicznie dodatnich waha się od 42,8 do 50% podczas gdy u kotów utrzymywanych wyłącznie w domu jedynie 6,2%. Częściej stwierdzał odczyny dodatnie u samic, niż u samców oraz częściej w grupie zwierząt starszych niż u młodych. Szkoda, że nie ocenił za pomocą metod statystycznych istotności tych różnic. Nieco niefortunnie również przedstawił dane w postaci wykresów: Ryciny 4.1 i 4.2 uważam za całkowicie zbędne (powody – tak jak poprzednio).. Uwaga ta będzie dotyczyła także kolejnych podrozdziałów poświęconych następnym gatunkom żywicieli. Ryciny 4.3 i 4.4 wymagają korekty. Przedstawiają one liczby zwierząt zarażonych i niezarażonych oraz odsetki. Wydaje się, że dla łatwości odbioru należy zrezygnować z przedstawiania w postaci słupków liczby zwierząt serododatnich i seroujemnych pozostawiając jedynie odsetek seroreagentów i liczbę [n]. Wydaje się też, że nie można w opisie różnicować zwierząt na zarażone i zdrowe – występowanie poziomu przeciwciał nie świadczy bowiem o istnieniu choroby.

U świń odsetek zwierząt seropozytywnych wyniósł 19,2% i wahał się w poszczególnych województwach od 11% w województwie małopolskim do 35% w woj. pomorskim. Myślę, że analiza dotycząca województw jest wystarczająca. Ze względu na niewystarczającą liczbę pozyskanych próbek w niektórych powiatach „rozbiecie” wyników na poszczególne powiaty jest chyba niepotrzebne.

Bardzo duży odsetek reakcji pozytywnych w teście ELISA Doktorant stwierdził również w przypadku surowic owiec (ponad 55%). Z analizy uzyskanych wyników wysnuł wniosek o częstszym występowaniu dodatnich odczynów serologicznych u zwierząt starszych. Ze względu na stosunkowo małe różnice pomiędzy poszczególnymi grupami wiekowymi, stwierdzenie takie warto było by jednak poprzeć odpowiednio dobraną analizą statystyczną. To samo dotyczy analizy występowania odczynów serologicznych w stadach różnej wielkości.

Kolejno Autor przedstawił wyniki dotyczące występowania przeciwciał anty-*Toxoplasma gondii* u bydła. Wyniki te uzyskał badając imponującą pulę surowic, bo aż 4284 surowice. Przy wyznaczonej dla tej grupy zwierząt wartości progowej absorbancji równej

0,323, wyniki dodatnie Doktorant uzyskał w 133 przypadkach (3,1% wszystkich surowic od bydła) przy czym w większości były to wyniki o stosunkowo niskich wartościach absorbancji (<0,4). Bardzo istotną obserwacją lek. wet. Bartosza Dominiak-Górskiego było stwierdzenie, że odsetek wyników dodatnich w teście ELISA maleje wraz ze wzrostem liczebności stad. Zilustrował to tabelą i wykresem, w których brak jest jednak informacji o liczbie zwierząt w każdym ocenianym przedziale. Nie mając możliwości w związku z tym powtórzenia obliczeń Doktoranta, to jednak obawiam się, że popełnił w nich błąd. Przekonanie takie wynika z tego, że zakres odsetków wyników dodatnich w poszczególnych grupach stad waha się od 9,35% (stada o wielkości >100 szt. bydła) do 16,7% (stada liczące 1-5 sztuk). Minimum w tej analizie jest wyższe od średniej wyliczonej dla całej populacji. Jest to błąd, chyba, że Doktorant zastosował jakiś algorytm obliczeń populacyjnych mi osobiście nieznanym.

Kolejne dwa wykresy ilustrują zależność odsetka wyników dodatnich od wieku bydła oraz płci. Zgadając się z obserwacjami Doktoranta i uważając je za cenne sędzę, że zamieszczanie oprócz odsetka także liczby zwierząt seropozytywnych w każdej grupie, niepotrzebnie komplikuje wykresy i znacznie utrudnia ich odbiór.

Poza wymienionymi wyżej gatunkami zwierząt lek. wet. Bartosz Dominiak-Górski przeprowadził również badania serologiczne koni. Gatunek ten uważany jest za mało podatny na zarażenie *Toxoplasma gondii*. W związku z czym, badania koni w kierunku toksoplazmozy należą do rzadkości. Tym bardziej należy docenić wysiłek Autora, który do testów pozyskał aż 186 surowic od tego gatunku. Wyniki dodatnie za pomocą testu ELISA uzyskał dla 39 surowic (21%). Pewną dysproporcję stwierdził w odsetku wyników u samców i samic (odpowiednio 21,7% i 16,7%). Stwierdził również, że podobnie jak w przypadku innych gatunków odsetek zwierząt seropozytywnych wzrasta z wiekiem. I tak w grupie zwierząt poniżej 1 roku życia nie stwierdził w ogóle wyników dodatnich, w grupie zwierząt 2-letnich ok. 7-8% takich wyników, a u zwierząt 10-letnich ponad 45%. Są to ważne osiągnięcia Autora, lecz przed publikacją tych wyników proponuję przeprowadzenie odpowiedniej analizy statystycznej.

Wydaje mi się bowiem, że statystyka nie jest najmocniejszą stroną ocenianej pracy. Doktorant nie wykonał odpowiednich obliczeń statystycznych tam, gdzie były one raczej wskazane np. analizując u poszczególnych gatunków zwierząt zależność pomiędzy odsetkiem wyników dodatnich, wiekiem zwierząt, płcią, warunkami utrzymania czy chowu. Takie informacje podane nawet w postaci znaczników wskazujących na istotność statystyczną różnic, czy też jej brak ułatwiły by znacznie czytelnikowi odbiór pracy. Doktorant umieścił natomiast w pracy cały osobny rozdział poświęcony analizie statystycznej uzyskanych wyników. Muszę jednak zaznaczyć, że jego ocena jest dla mnie niezwykle trudna. Brak jest bowiem jasno

przedstawionych założeń prowadzonych analiz. Zrozumienia nie ułatwiają również mało precyzyjne tytuły podrozdziałów.

Nie rozumiem na przykład tytułu podrozdziału 5.2 pt. „Występowanie ekstynkcji w badanych grupach zwierząt” – czy chodzi o to, że u jednych zwierząt (w jednych próbkach) występowały „ekstynkcje”, a u drugich nie? Niejasny jest też cel i sposób przeprowadzonych w nim obliczeń. Po pierwsze Doktorant nie analizował ekstynkcji tylko liczby/odsetki wyników dodatnich i ujemnych. Nie wiem też, czy testem dwumianowym Autor analizował istotność statystyczną różnicy pomiędzy odsetkiem zwierząt seropozytywnych i seronegatywnych dla każdego gatunku? Wskazuje na to podana proporcja testowa 0,5 przy każdym gatunku w odniesieniu do odczynów „+” i „-”. Przyznam się, że umyka mi sens takiej analizy i założenia, że w populacji „powinno być” 50% reagentów seropozytywnych, a testowana jest istotność odchylenia od tego „stanu równowagi”.

Większy sens ma analiza porównująca odsetki seropozytywnych wyników pomiędzy poszczególnymi gatunkami. Niepełny opis przeprowadzonych obliczeń uniemożliwia jednak ocenę ich prawidłowości.

Nietrafiona według mnie jest również analiza przedstawiona w pkt. 5.4. Jako, że Autor zmiareczkował opracowany przez siebie test ELISA osobno dla każdego gatunku (co jest oczywiste), stosując różne rozcieńczenia przeciwciał II-rzędowych, różnych producentów i ustawił wartość graniczną „cut-off” na różnym poziomie dla każdego gatunku (co również jest zrozumiałe), porównywanie bezpośrednie wartości ekstynkcji wydaje się nie mieć uzasadnienia.

Kolejnym ocenianym rozdziałem jest Dyskusja. W rozdziale tym Autor wiele miejsca poświęcił omówieniu takich zagadnień jak „Diagnostyka laboratoryjna toksoplazmozy” (w tym testom ELISA i MAT), czy roli zwierząt jako wektorów toksoplazm dla człowieka. Podrozdziały te, liczące w sumie 10 stron, w mojej opinii powinny wzbogacić wstęp, jako że nie dotyczą bezpośrednio wyników uzyskanych przez lek. wet. Bartosza Dominiak-Górskiego. Podobnymi „wstępami” (lub zakończeniami) Autor wzbogacił również kolejne części dyskusji poświęcone wynikom badań poszczególnych gatunków zwierząt opracowanym przez siebie testem ELISA. Ze względu na obszerność tych części proponowałbym także je przenieść do wstępu, umiejętnie wplatając w jego treść lub całkiem z nich zrezygnować. Dlatego też w dalszej części ograniczę ocenę pracy do właściwej dyskusji, czyli zaprezentowania wyników własnych badań na tle wyników uzyskanych przez innych badaczy, prób wytłumaczenia czynników mogących wpływać na te wyniki, oceny przydatności ich dla nauki i praktyki itp.

Właściwa dyskusja rozpoczyna się na 10 stronie tego rozdziału stwierdzeniem Doktoranta, że przedstawiona praca doktorska jest pierwszą obejmującą badaniami immunoenzymatycznymi tak obszerny materiał i w skali Polski jest to niewątpliwie prawda. Trafnie określa również wartość uzyskanych wyników, choć stwierdzenie, że dane dotyczące de facto ekstensywności inwazji dostarczają informacji nt. „objawów i przebiegu choroby” są już pewnym nadużyciem.

Rozpoczynając dyskusję w części dotyczącej wyników surowic kocih Doktorant podkreśla wagę tego żywiciela w krążeniu pasożyta w środowisku oraz jako źródła zarażenia owiec. Należy jednak pamiętać, że owce poza zarażaniem się oocystami mogą zarażać się również drogą pionową. Autor porównuje wyniki badań własnych z wynikami badań innych autorów, a na podstawie różnic w odsetku seroreagentów w grupach kotów mających kontakt ze środowiskiem zewnętrznym i utrzymywanych tylko w domach wysnuwa ciekawy wniosek o rozprzestrzenieniu oocyst w środowisku. Myślę, że równouprawnionym byłby wniosek o możliwości polowań przez koty na typowych żywicieli pośrednich jakimi są gryzonie.

Dyskusja wyników uzyskanych dla świń przeprowadzona jest w zasadzie prawidłowo, choć niekiedy Doktorant zbyt daleko w mojej ocenie odbiega w niej od wyników własnych, a rozdział zaczyna przybierać formę artykułu przeglądowego.

W kolejnej części dotyczącej wyników owiec lek. wet. Bartosz Dominiak-Górski zauważa, że własne wyniki nie potwierdziły wpływu wielkości stad (i co za tym idzie warunków utrzymania) na częstość występowania dodatnich odczynów serologicznych u tego gatunku żywicielskiego. Jest to dość nieoczekiwane spostrzeżenie i szkoda że wątku tego Autor nie rozwinął. Szkoda również, że w zasadzie nie ustosunkował się do częstości stwierdzania dodatnich odczynów serologicznych u tego gatunku przez innych badaczy.

Bardzo pozytywnie na tle dyskusji dotyczącej wyników owiec należy ocenić przedyskutowanie wyników uzyskanych u bydła, do której nie mam żadnych zastrzeżeń. Również dyskusja w części dotyczącej wyników uzyskanych dla surowic końskich zawiera elementy niezbędne w tego typu analizie. Ważne było by jednak wyraźniejsze podkreślenie osobistego stosunku Autora do uzyskanych wyników.

Kolejna część dyskusji – pkt. 6.4 „Rekombinowane białka antygenowe jako nowe narzędzie rozpoznawania toksoplazmozy u zwierząt” oraz pkt. 6.5 „Zapobieganie, zwalczanie, szczepienia” są w zasadzie osobnymi artykułami popularnonaukowymi i luźno tylko związane są z pracą.

Z kolei pkt. 6.6 „Podsumowanie” stanowi połączenie kilku istotnych, lecz nie niezbędnych w tej części pracy uwag ogólnych na temat toksoplazmozy.



Jak wspomniano, praca nie jest zakończona wnioskami.

Z obowiązku recenzenta wspomnę również o kilku ważniejszych dostrzeżonych przeze mnie błędach natury redakcyjnej, stylistycznej:

- str 3 – w postaci wrodzonej toksoplazmozy może, lecz wcale nie musi dochodzić do powstawania „wad letalnych”
- str 3 – zwierzęta gospodarskie są jedynie jednymi z żywicieli pośrednich - sposób zapisu Autora sugeruje że zwierzę gospodarskie i żywiciel pośredni to w tym przypadku niejako synonimy
- str. 8 – przy podaniu odsetków ludzi zarażonych *T. gondii* na świecie należy podać źródło informacji
- str 9 - zamiast „wśród człowieka” – wśród ludzi
- str. 10 – zdanie początkowe 2-go akapitu „ Umiejętność *T gondii*... „ należy przeredagować
- str. 12 – zamiast „puste niewybarwione pola” – „uszkodzone, niewybarwione tachyzoity”
- str 13 – w przedostatnim zdaniu 2-go akapitu zamiast tachyzoity – bradyzoity
- str. 14 – w 1-szym akapicie zamiast stadium rozwoju rozwojowego – np. stadium cyklu rozwojowego
  - zamiast stałocieplne ssaki i ptaki – ptaki i ssaki (nie słyszałem o zmiennocieplnych ptakach czy ssakach).
- str. 15 – użyte sformułowanie sugeruje, że oocysty występują tylko w komórkach nabłonka jelit kota, podczas gdy jako stadium dyspersyjne stwierdzane są też w środowisku
- str. 16. – kompleks apikalny występuje dość powszechnie – np. u kokcydiów
- str. 17 – ponownie pojawia się stwierdzenie, że „żywicielem pośrednim *T. gondii* są wszystkie zwierzęta stałocieplne – teza dość radykalna i na pewno nie u wszystkich gatunków obecność *T. gondii* została potwierdzona
- str. 19 – oocysty nie powstają na drodze gametogonii tylko na drodze zapłodnienia
- str. 31 – dość niespotykane brzmi użyte w ostatnim akapicie sformułowanie „dyskomfort w jamie brzusznej” jako jeden z objawów klinicznych toksoplazmozy u kotów

- str. 43 i dalej – zamiast „preparatów antygenowych” proponuję użyć „antygenów”
- str. 54 – w hipotezie badawczej w ostatnim zdaniu Autor dość kategorycznie wyraża się o konieczności wprowadzenia badań zwierząt rzeźnych w kierunku toksoplazmozy. Trudno się z tym zgodzić biorąc pod uwagę powszechność występowania inwazji (co robić ze zwierzętami dodatnimi), koszt badania, czas oczekiwania na wynik (wcześniej mięso trafia do sprzedaży) itp.
- str. 71 – Autor w 1-szym akapicie pomylił pojęcia rozcieńczenia surowicy i miana (przypomnę, że miano to najwyższe rozcieńczenie surowicy, w którym w danym teście uzyskuje się wynik dodatni).
- str. 77 – użyto sformułowania „częstość zarażenia kotów na toksoplazmozę” – powinno być „częstość zarażenia kotów toksoplazmami”
- str. 98 – Autor jako synonimy podaje żywotność i zaraźliwość pierwotniaka, podczas gdy są to dwa różne pojęcia
- W kilku miejscach w pracy Doktorant zamiennie używa pojęć zwierzę zarażone i zwierzę chore – jest to błędem.

Podsumowując uważam, że Doktorant z rozmachem podszedł do rozwiązania postawionego sobie zadania. Przeprowadził badania na bardzo dużym materiale, w skali dotąd nie odnotowanej w kraju. Mimo zdecydowanie niepełnej walidacji opracowanego przez siebie testu ELISA uzyskał ciekawe wyniki, w niektórych miejscach wręcz unikatowe. Zrealizował tym samym zasadniczy cel pracy, którym jak przypomnę było „oszacowanie występowania swoistych przeciwciał przeciwko *Toxoplasma gondii* w surowicy pięciu gatunków zwierząt: kotów, bydła, koni, owiec i świń.”

W pracy nie ustrzegł się, co prawda, kilku poważnych błędów – zbyt swobodnie np. podszedł do Dyskusji, obszernie omawiając zagadnienia pośrednio tylko związane z tematem pracy, a lakonicznie i nie zawsze właściwie dyskutując wyniki własne. Pracy nie podsumował, być może przez przeoczenie, wnioskami co uważam za poważny błąd. Obliczenia statystyczne, choć nie bezwzględnie konieczne w pracy o charakterze rejestracyjnym, wydają się nie zawsze właściwie przeprowadzone. W tym miejscu powtórzę, że przed ewentualną publikacją warto jednak wyniki podeprzeć prawidłowo przeprowadzoną analizą statystyczną i przyjrzeć się jeszcze raz wykresom i tabelom. W sumie jednak stwierdzone niedociągnięcia nie przesłaniają pozytywnych elementów pracy takich jak bogaty wstęp świadczący o dobrej znajomości tematyki, olbrzymi materiał badawczy i rozmach przeprowadzonych badań, ciekawe wyniki,

które zapewne będą wykorzystywane przez innych autorów np. w prezentacjach tła epidemiologicznego toksoplazmozy oraz interesujące analizy niektórych aspektów uzyskanych wyników.

**Dlatego też stwierdzam, że praca doktorska lek. wet. Bartosza Dominiak-Górskiego pt.: „Oszacowanie występowania przeciwciał przeciwko *Toxoplasma gondii* u zwierząt gospodarskich i towarzyszących jako potencjalnego źródła zarażenia ludzi odpowiada warunkom określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i wnoszę o dopuszczenie lek. wet Bartosza Dominiak-Górskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Tomasz Cencach