dr hab. Wojciech Zygner
Zakład Parazytologii i Inwazjologii
Katedra Nauk Przedklinicznych
Instytut Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie

09.11.2021 Warszawa

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pana lekarza weterynarii Łukasza Mazurka zatytułowanej
"Badania nad epidemiologią bartonelozy kotów w aspekcie zdrowia publicznego"
wykonanej na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie
pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Łukasza Adaszka

Przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską stanowi spójny tematycznie cykl 5 artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych wraz z autoreferatem i oświadczeniami współautorów, który zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 Nr 65 poz. 595 z późn. zm.) w zw. art. 179 ust. 3 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r. poz. 1669) może być podstawą do uzyskania stopnia naukowego doktora przez Pana lekarza weterynarii Łukasza Mazurka.

Oceniana rozprawa doktorska w formie autoreferatu liczy 82 strony (84 strony w wersji elektronicznej; dwie ostatnie strony są puste), na co składają się: strona tytułowa, oświadczenia autora rozprawy i promotora, streszczenie dysertacji wraz ze słowami kluczowymi w języku polskim i angielskim, spis treści, dyplom ukończenia studiów, wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wraz z oświadczeniami Doktoranta o jego wkładzie w ich powstanie, wstępu omawiającego bartonelozę u kotów wraz z zagrożeniem zoonotycznym, streszczenia poszczególnych publikacji wraz z omówieniem wykorzystania uzyskanych wyników, cele pracy, omówienie poszczególnych etapów badań, wnioski, piśmiennictwo, publikacje oraz oświadczenia współautorów określające ich indywidualny wkład w ich powstanie. Główną część dysertacji stanowi 5 publikacji, w których Doktorant deklaruje swój wkład w ich przygotowanie na poziomie od 50 do 60 %, oraz określa na czym polegał jego wkład. We wszystkich publikacjach Doktorant jest pierwszym autorem, natomiast autorem korespondencyjnym jest w jednej (ostatniej) publikacji. W przypadku pozostałych 4 prac autorem korespondencyjnym jest Promotor rozprawy doktorskiej prof. dr hab. Łukasz Adaszek.

Wszystkie 5 publikacji stanowi spójny tematycznie cykl. Cztery prace opublikowano w języku angielskim, jedną natomiast w języku polskim. Wszystkie prace ukazały się w recenzowanych czasopismach naukowych, spośród których 4 artykuły opublikowano w czasopismach posiadających współczynnik wpływu (impact factor) indeksowanych w bazie Web of Science Core Collection (dwa artykuły w czasopiśmie Medycyna Weterynaryjna, 1 artykuł w czasopiśmie Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 1 artykuł w czasopiśmie Journal of Veterinary Research), natomiast 1 artykuł ukazał się w czasopiśmie nieposiadającym impact factor wg. Web of Science Core Collection (czasopismo: Annals of Parasitology).

W swojej pracy doktorskiej lek. wet. Łukasz Mazurek zajął się zagadnieniem ważnym z naukowego i praktycznego punktu widzenia jakim jest bartoneloza kotów. Choroba ta jest groźną zoonozą powodowaną przez bakterie z rodzaju *Bartonella*. Pierwsze dwie publikacje z cyklu są

pracami przeglądowymi, w których omówiono patogenezę i objawy kliniczne bartonelozy u ludzi i kotów, metody diagnostyczne oraz leczenie i zapobieganie chorobie. Prace te w znacznym stopniu się pokrywają i mogłyby być opublikowane jako jeden artykuł. Ponadto, w drugiej publikacji przeglądowej omówiono rolę pcheł w przenoszeniu bakterii z rodzaju *Bartonella* oraz potencjalną rolę kleszczy w rozprzestrzenianiu tych zarazków. Publikacje te ukazały się w 2018 roku w czasopismach: Medycyna Weterynaryjna oraz Annals of Parasitology.

W trzeciej publikacji przedstawiono wyniki badań, w których poszukiwano DNA *B. henselae* i *B. clarridgeiae* we krwi 40 psów z gospodarstw domowych, w których koty zakażone były *B. henselae* i miały objawy kliniczne bartonelozy. W badaniach tych wykryto DNA *B. henselae* u 10% psów, jednak u żadnego psa nie występowały objawy kliniczne. Co ciekawe u wszystkich psów z wyjątkiem jednego stosowano zabezpieczenie przed pasożytami zewnętrznymi w różnych postaciach, co wskazywać może, że psy ulegały zakażeniu za pośrednictwem kotów. W publikacji podano, że celem tej pracy było określenie częstości występowania zakażeń spowodowanych przez bakterie z rodzaju *Bartonella* u psów. Cel ten nie został jednak wymieniony wśród celów recenzowanej dysertacji. Publikacja ukazała się w 2019 roku w czasopiśmie Annals of Agricultural and Environmental Medicine.

Kolejna, czwarta, publikacja przedstawia wyniki badań, których celem było określenie sytuacji epizootycznej zakażeń spowodowanych przez bakterie z rodzaju *Bartonella* u kotów we wschodniej części Polski. W tych badaniach określono prewalencję zakażeń, czynniki ryzyka oraz zidentyfikowano gatunek bakterii odpowiedzialnej za bartonelozę u kotów w części wschodniej Polski, którym okazał się gatunek *B. henselae*. Zakażenia stwierdzono u ponad 40 % badanych kotów, a zidentyfikowanymi czynnikami ryzyka zakażenia były: wychodzenie kotów na dwór, rasa kota (kot mieszańce), region, z którego pochodziły koty (województwo podkarpackie) oraz brak stosowania preparatów przeciwko pasożytom zewnętrznym. W pracy zwrócono jednak uwagę, że prawdopodobnie to nie rasa kota wpływa na zakażenie, lecz fakt, że koty nierasowe są częściej kotami wychodzącymi. W tych badaniach zrealizowano częściowo pierwszy oraz w całości drugi cel rozprawy doktorskiej. Publikacja ukazała się w 2020 roku w czasopiśmie Journal of Veterinary Research.

W ostatniej, piątej pracy z cyklu, określono przebieg kliniczny bartonelozy u 24 kotów, co było realizacją ostatniego celu rozprawy doktorskiej. U kotów występowały różne objawy kliniczne. Najczęściej u zakażonych kotów stwierdzano występowanie alergicznego pchlego zapalenia skóry, gorączki i biegunki, natomiast w badaniach krwi najczęstszą zmianą była małopłytkowość. Publikacja ukazała się w 2021 roku w czasopiśmie Medycyna Weterynaryjna.

Pokrótce scharakteryzowane publikacje Doktoranta stanowiące podstawę jego dysertacji pokazują, że praca Doktoranta miała charakter koncepcyjny, co stanowi o spójności tematycznej przedstawionego cyklu publikacji, a to z kolei jest warunkiem niezbędnym do uznania zbioru artykułów naukowych za formę rozprawy doktorskiej. W oparciu o analizę przedstawionych do oceny 5 publikacji naukowych uważam, że cele pracy zostały zrealizowane. Jednakże w pierwszym celu rozprawy Doktorant zaplanował przeprowadzenie charakterystyki molekularnej, która została zrealizowana dosyć powierzchownie. Tu pojawia się moja pierwsza i najważniejsza uwaga krytyczna. Uzyskany w badaniach metodą PCR produkt został zsekwencjonowany. W żadnej z prac nie zamieszczono jednak uzyskanej sekwencji produktu, nie przeprowadzono analizy filogenetycznej, ani nie określono szczepu/genotypu (Houston-1 lub Marseille). A zakładam, że takie dane powinny pojawić się w charakterystyce molekularnej.

Z przeprowadzonych badań Doktorant wyciągnął 5 wniosków, choć cele były 3. Wnioski nr 1 i 2 odpowiadają drugiemu celowi pracy tj. określenie czynników ryzyka zakażeń u kotów. Wniosek nr 3 odpowiada pierwszemu celowi pracy tj. określenie gatunku bakterii z rodzaju *Bartonella* powodujące zakażenia u kotów we wschodniej części Polski. Doktorant jednak stwierdza na wyrost, że gatunek *B. henselae* jest gatunkiem dominującym u kotów w Polsce, choć jego badania nie obejmowały całej Polski. Wniosek nr 4 odpowiada celowi nr 3 rozprawy doktorskiej, w którym Doktorant zwraca uwagę na zróżnicowany przebieg bartonelozy u kotów i podkreśla potrzebę uwzględniania jej w diagnostyce różnicowej u kotów mających kontakt z pchłami, a zwłaszcza u tych, u których stwierdzono małopłytkowość. Wniosek nr 5 nie do końca odpowiada zaplanowanym celom pracy. We wniosku tym Doktorant stwierdza, że bartoneloza stanowi największe zagrożenie dla kotów, a czynnikiem etiologicznym jest gatunek *B. henselae*, co pokrywa się z pierwszym celem dysertacji i wnioskiem nr 3. Zawarte we wniosku nr 5 odniesienia do psów mają swoje odzwierciedlenie w publikacji nr 3, nie zostały one jednak wymienione wśród celów samej dysertacji. Z kolei zawarte w tym wniosku odniesienia do ludzi, pomimo, że prawdopodobnie są zgodne z prawdą, nie były jednak przedmiotem badań Doktoranta i nie były one również wymienione w celach rozprawy doktorskiej.

Obowiązkiem recenzenta jest również zwrócenie uwagi na błędy i nieścisłości, które pojawiają się w dysertacji, w tym również w samych publikacjach:

- Zarówno w autoreferacie jak i we wszystkich 5 publikacjach Doktorant podaje, że bakterie z rodzaju *Bartonella* należą do rzędu Rickettsiales. Natomiast według systematyki NCBI rodzaj ten należy do rzędu Hyphomicrobiales (Hördt i wsp. 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.00468). Propozycja usunięcia tego rodzaju z rzędu Rickettsiales pojawiła się już w 1993 roku (Brenner i wsp. 1993, doi: 10.1099/00207713-43-4-777). O ile w publikacjach Doktoranta do 2020 roku mogła być stosowana wcześniejsza przynależność systematyczna, o tyle w ostatniej publikacji z 2021 roku oraz w samym autoreferacie powinna pojawić się już nowa aktualna systematyka rodzaju *Bartonella*.
- W autoreferacie jak i w publikacjach nr 1, 2 i 4 Doktorant zamieszcza informację, według której do rodzaju *Bartonella* należą 24 gatunki bakterii. Z kolei w publikacji nr 3 do rodzaju *Bartonella* Doktorant zalicza 45 gatunków. Domyślam się, że dane pochodzą z różnych źródeł, jednakże w związku z tymi rozbieżnościami powinno to być doprecyzowane w samym autoreferacie, który przecież pisany był już po opublikowaniu całego cyklu prac.
- Doktorant w autoreferacie używa obcych określeń z całkowitym pominięciem polskich odpowiedników np. trombocytopenia zamiast małopłytkowość czy ektopasożyty zamiast pasożyty zewnętrzne.
- W streszczeniu rozprawy po angielsku nie zastosowano ani razu kursywy w łacińskiej pisowni nazw rodzajowych i gatunkowych wymienionych tam bakterii i pasożytów, choć w polskiej wersji streszczenia Doktorant stosował kursywę za każdym razem, gdy było to konieczne.
- W wykazie publikacji Doktorant podaje swój szacowany procentowy wkład w powstanie poszczególnych prac wraz z uszczegółowieniem na czym polegał jego wkład. W publikacja nr 1 i 2, które są pracami przeglądowymi, Doktorant deklaruje, że jego udział poza przygotowaniem manuskryptu polegał na zaplanowaniu doświadczenia i przeprowadzeniu części badań. W pracach tych nie przeprowadzano jednak żadnych

badań doświadczalnych, gdyż są to publikacje o charakterze przeglądowym. Ponadto, Współautorzy w swoich oświadczeniach do tych dwóch publikacji nie wspominają o reszcie badań (choć Doktorant deklaruje jedynie część badań). Współautorzy deklarują natomiast udział w przygotowaniu manuskryptu i zebraniu piśmiennictwa. W oświadczeniu do publikacji nr 2 jeden ze współautorów również deklaruje zebranie części materiałów do badań.

- W przypadku publikacji nr 4 brak informacji w oświadczeniu autora i oświadczeniach współautorów, kto przeprowadził analizy statystyczne. Jest to o tyle zaskakujące, że w publikacji nr 5 analiza statystyczna jest znacznie prostsza, a mimo to wyróżniono współautora, który tę analizę w pracy nr 5 przeprowadził. W przypadku publikacji nr 4 brak również informacji kto zbierał materiał do badań (krew od 672 kotów). Czy byli to lekarze weterynarii z różnych lecznic weterynaryjnych? Zgodnie z oświadczeniami współautorzy zbierali część piśmiennictwa i/lub przygotowali część manuskryptu. Ponadto, w odniesieniu do tej pracy Doktorant deklaruje wykonanie części badań molekularnych. Jednak żaden ze współautorów nie deklaruje wykonania reszty badań molekularnych.
- Pozostając jeszcze przy oświadczeniach współautorów, jeden ze współautorów publikacji nr 4 (Alfonso Carbonero) podpisał oświadczenie napisane po polsku. Wskazując, że jest to błąd zakładam, że wspomniany współautor z Hiszpanii nie zna języka polskiego. W moim przekonaniu to oświadczenie współautora powinno być napisane w języku angielskim (zakładam, że ten współautor posługuje się językiem angielskim, skoro jako pierwszy autor i współautor opublikował wiele prac naukowych w tym języku).
- W autoreferacie pojawia się również wiele błędów związanych z piśmiennictwem. Sposób cytowania prac jest niekonsekwentny: od strony 12 do strony 16 autoreferatu prace wieloautorskie cytowane są w sposób: nazwisko i in. np. Foil i in. 1998; Reis i in. 2011. Z kolei od strony 22 autoreferatu prace takie cytowane są w sposób: nazwisko i wsp. np. Biancardi i wsp. 2014, Chomel i wsp. 2014, Januszkiewicz i wsp. 1985. Ponadto, wielu cytowań brakuje w wykazie piśmiennictwa np. Reis i in. 2011, Welc-Falęciak i in. 2010, 2013, Kitchell i in. 2000.
- Kolejnymi błędami związanymi z piśmiennictwem jest brak jakichkolwiek cytowań np. ostanie 3 linie w pierwszym akapicie i cały drugi akapit na stronie 13, drugi akapit na stronie 14, ostatni akapit na stronie 16, trzeci akapit na stronach 18 i 30 (podane sekwencje starterów nie są opracowane przez Doktoranta).
- Innym rodzajem błędów piśmiennictwa jest niepełne cytowanie np. w pierwszym akapicie na stronie 15 autoreferatu Doktorant wymienia metody immunologiczne stosowane w diagnostyce bartonelozy kończąc ten akapit cytowaniem jednej pracy (Adamska 2010), w której metody te w ogóle nie są wymieniane.
- Kolejnym błędem w piśmiennictwie jest niejednolity sposób wykazywania cytowanych prac np. czasem rok publikacji jest bezpośrednio za nazwiskami autorów, a w przypadku innych prac rok publikacji pojawia się za jej tytułem.
- Innym błędem w piśmiennictwie jest użycie imienia autora zamiast jego nazwiska zarówno w tekście jak i w wykazie literatury. Dotyczy to cytowania "Craig i wsp. 2010" na stronie 33 autoreferatu oraz wykazu piśmiennictwa w publikacji nr 5. Nazwisko autora to Greene a Craig to jego pierwsze imię. W tym cytowaniu pojawiają się jednak

jeszcze kolejne błędy. Otóż cytowany autor jest redaktorem wieloautorskiego podręcznika do chorób zakaźnych psów i kotów, natomiast autorem rozdziału na temat bartonelozy u kotów jest Lynn Guptill-Yoran. Nazwisko tego autora nie jest jednak wymienione ani w autoreferacie ani w publikacji nr 5, jak również nie został podany tytuł rozdziału i zakres stron a jedynie tytuł podręcznika. Ostatnim błędem dotyczącym tego cytowania jest podanie tytułu po angielsku z równoczesnym podaniem polskiego wydawcy i rokiem polskiego wydania (Wydawnictwo Galaktyka, Łódź, 2010), które jest tłumaczeniem podręcznika wydanego po angielsku w roku 2006 (Saunders Elsevier, St. Louis, 2006, wydanie trzecie).

- Kolejnym błędem w cytowaniach są błędy w zapisie nazwiska cytowanego autora np. w publikacji nr 3 i nr 5 nazwisko pierwszego autora publikacji, z której wykorzystano sekwencje starterów zapisano w tekście pracy jako "Staggemeter", podczas gdy powinno być: Staggemeier.
- Jeszcze innym błędem odnośnie piśmiennictwa jest cytowanie pracy, w której nie ma informacji podawanej przez Doktoranta np. w publikacji nr 5 na stronie 209 (drugi akapit) napisano, że choroba jest rzadko diagnozowana u kotów w Polsce, a dane na temat jej przebiegu są niepełne. W tym miejscu powołano się na artykuł nr 23 z wykazu piśmiennictwa. Tym artykułem jest praca przeglądowa włączona do niniejszej dysertacji jako publikacja nr 1 na temat choroby kociego pazura u ludzi. W tej cytowanej (publikacji nr 1) nie ma żadnych informacji na temat tego jak często zakażenia *B. henselae* są diagnozowane u kotów a jedynie jak często zakażenia występują u ludzi. Nie ma tam również informacji jaki jest przebieg zakażenia u kotów, a jedynie jak przebiega choroba u człowieka.
- Inną grupą błędów są nieścisłości autoreferatu z publikacjami w odniesieniu do metodyki np. według autoreferatu (strona 18) oznaczenia biochemiczne przeprowadzono za pomocą analizatora Mindray BS-130, natomiast w publikacji nr 5 (strona 207) oznaczenia biochemiczne przeprowadzono za pomocą analizatora Mindray BS-120. Innym przykładem jest zastosowany zestaw do izolacji DNA. Według autoreferatu do izolacji DNA z krwi stosowano zestawy dwóch różnych firm, polskiej i niemieckiej (strona 18), natomiast według publikacji nr 3 (strona 669), publikacji nr 4 (strona 80) i publikacji nr 5 (strona 207) stosowano zastaw do izolacji DNA jednej i tej samej firmy (polskiej) we wszystkich trzech publikacjach.
- Ostatnim błędem, na który chciałem zwrócić uwagę jest pewne zaburzenie chronologii badań i publikacji, które pojawia się w autoreferacie na końcu strony 19 i początku strony 20. Doktorant w tym miejscu po krótkim omówieniu wyników z publikacji nr 4 na temat prewalencji i czynników ryzyka bartonelozy u kotów we wschodniej części Polski podaje, że w kolejnym etapie badań określono częstość występowania DNA bakterii z rodzaju *Bartonella* u psów mających kontakt z kotami chorymi na bartonellozę, co opublikowano w pracy nr 3. Ta zmiana chronologii badań wprowadza pewne zamieszanie dodatkowo utrudniając czytanie rozprawy. Według kolejności publikowania prac, dat wysyłania manuskryptów do redakcji czasopism, samego wykazu publikacji oraz kolejności omawiania tych badań w dalszej części autoreferatu wydaje się, że najpierw badano psy, a później określano prewalencję i czynniki ryzyka bartonelozy u kotów. Choć zdaję obie sprawę, że zbieranie materiału do badań często

odbywa się równocześnie do różnych prac, to jednak Doktorant powinien trzymać się chronologii badań, którą przyjął już wcześniej.

Dostrzeżone przeze mnie błędy bądź nieścisłości nie wpływają na wartość poznawczą przeprowadzonych badań, utrudniają jednak czytanie pracy i czasem wręcz uniemożliwiają sięgnięcie do piśmiennictwa, gdyż zdarza się, że zwyczajnie nie wiadomo jaką pracę Doktorant cytuje w autoreferacie.

Oprócz zwrócenia uwagi na błędy i nieścisłości mam również kilka uwag krytycznych względem ocenianej rozprawy doktorskiej i przeprowadzonych badań z czego wynikają również moje pytania do Doktoranta:

- We wstępach do publikacji nr 4 i 5 podano informację, że głównymi wektorami bartonelozy u kotów są pchły i kleszcze powołując się w pracy nr 5 na własną publikację przeglądową (publikacja nr 2 z ocenianego tu cyklu prac) oraz bez podania źródła w przypadku publikacji nr 4. W zacytowanej publikacji nr 2 omawiane są jedynie prace, w których wykazano obecność DNA bakterii z rodzaju *Bartonella* w kleszczach, które do tych badań były rozcierane podczas izolacji DNA. Kleszcze jako pasożyty krwiopijne jak najbardziej mogły zawierać w sobie DNA bakterii obecnych we krwi żywicieli kleszczy. Nie jest to jednak dowód na przenoszenie przez kleszcze tych bakterii. W publikacji nr 2 pojawia się również informacja, że w warunkach in vitro potwierdzono obecność *Bartonella henselae* w ślinie kleszczy z rodzaju *Ixodes* powołując się na publikację Regier i wsp. 2017 (doi: 10.1186/s13071-017-2042-7), której autorzy stwierdzili obecność DNA *B. henselae* w tkankach usuniętych ze skóry serododatniego kota kleszczy. Kleszcze te rozcierano w moździerzu podczas izolacji DNA, co również nie jest dowodem na przenoszenie przez kleszcze tych bakterii. We wstępie do tej cytowanej przez Doktoranta pracy znajduje się jednak informacja o udanym przeniesieniu *B. henselae* przez kleszcza w warunkach in vitro, gdzie autorzy powołują się jednak na pracę w ogóle nie zacytowaną przez Doktoranta (Cotté i wsp. 2008, doi: 10.3201/eid1407.071110). W tej niezacytowanej pracy autorzy w sztucznych warunkach uzyskali przeniesienie *B. henselae* do krwi od zakażonego kleszcza *Ixodes ricinus*. W związku z tym moje pytanie do Doktoranta jest następujące: Czy zna Pan inną pracę badawczą, w której wykazano przenoszenie przez kleszcze bakterii *Bartonella henselae* w warunkach in vitro lub też in vivo u samych kotów? Takie prace powinny istnieć jeśli chcemy na dzień dzisiejszy stwierdzić, że do głównych wektorów bartonelozy u kotów oprócz pcheł należy zaliczyć również kleszcze.
- W publikacji nr 1 na stronie 694 zamieszczono zdanie "Wektorami choroby dla kotów są pchły, kleszcze oraz wszy żywiące się krwią ssaków" powołując się na publikację przeglądową, w której jednak podano, że głównym wektorem są pchły oraz wspomniano jedynie, że DNA *B. quintana* izolowano z kleszczy (chodzi tu o dorosłe osobniki *Ixodes pacificus*), które mogły zresztą zakazić się w stadium nimfy. W związku tym moje pytanie do Doktoranta jest następujące: Jakie zna Pan gatunki wszy pasożytujące u kotów, za pośrednictwem których zwierzęta te mogą zakazić się bartonelozą?
- W ostatnim akapicie publikacji nr 2 (strona 313) zamieszczono informację, według której obecnie wzrasta liczba przypadków bartonelozy u kotów w rejonach wcześniej

uznawanych z nie-endemiczne dla tej choroby, bez podania jakiegokolwiek cytowania dla całego akapitu. W związku z tym moje pytanie do Doktoranta jest następujące: Proszę podać jakie regiony uznawano pierwotnie za nie-endemiczne dla bartonelozy u kotów, w których obecnie stwierdzane są przypadki bartonelozy.

- W pracy nr 4 badano czynniki ryzyka zakażenia *B. henselae* u kotów. Doktorant nie stwierdził wpływu płci na zakażenie. Podział ze względu na płeć uwzględniał jednak tylko samce i samice, natomiast w pracy nie uwzględniono kastracji lub braku kastracji kotów. Breitschwerdt i wsp. 2005 (Intern J Appl Res Vet Med, 3(4), 2005, 287-302) wykazali, że ryzyko zakażenia wzrasta u niekastrowanych samców (artykuł cytowany przez Doktoranta w publikacji nr 5, pozycja 12 w wykazie piśmiennictwa). W związku z tym moje pytanie do Doktoranta jest następujące: Czy wiadomo ile zwierząt było kastrowanych? Zwłaszcza wychodzących samców? Te dwa czynniki razem (wychodzenie i brak kastracji samca) jako wpływające na skłonność do walk kotów mogą mieć wpływ na zakażenie *Bartonella henselae* u kotów. Zwłaszcza, że samo wychodzenie kotów z domu zwiększa ryzyko zakażenia ponad 3-krotnie.
- Odnośnie wpływu płci kota na ryzyko zakażenia bakteriami z rodzaju *Bartonella* w piątym akapicie dyskusji artykułu nr 4 znajduje się informacja, według której istnieją doniesienia sugerujące, że płeć kota może być czynnikiem predysponującym do rozwoju choroby. W tym miejscu powołano się na dwie publikacje nr 22 i 25 z wykazu piśmiennictwa do tego artykułu. Publikacja o numerze 22 jest pracą włączoną tu do rozprawy doktorskiej jako publikacja nr 3 (doi: 10.26444/aaem/105396), gdzie badano psy (32 samce i 8 samic) a nie koty i nie ma w niej również żadnych informacji odnośnie wpływu płci na zakażenie i rozwój choroby. Z kolei zacytowana publikacja nr 25 (doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02196.x) to wyniki badań kleszczy na obecność DNA bakterii z rodzaju *Bartonella* zebranych głównie z roślinności w różnych częściach Polski. W związku z tym moje pytanie do Doktoranta jest następujące: Jakie zna Pan doniesienia o wpływie płci kota na zakażenie *Bartonella henselae* i rozwój choroby?
- W publikacji nr 4 w tabeli nr 1 jedną ze zmiennych jest "Choroba". O jaką chorobę chodzi? Objawową bartonelozę czy jakąkolwiek chorobę współistniejącą z zakażeniem? W metodyce wspomniano o 384 chorych kotach i 288 zdrowych (razem 672). Natomiast wg tabeli nr 1 było 391 chorych kotów i 281 zdrowych kotów (razem również 672).
- W publikacji nr 4 w tabeli nr 2 przyjęto, że iloraz szans w modelu regresji logistycznej dla Podlasia wynosi 1. W związku z tym moje pytanie do Doktoranta jest następujące: Dlaczego w tym modelu wybrano województwo Podlaskie jako punkt odniesienia, skoro to na Mazowszu stwierdzono najniższy odsetek zakażeń? Wydaje się, że łatwiej by było stwierdzać o ile wzrasta ryzyko zakażenia względem województwa, w którym jest najmniej zakażeń. Z tabeli wynika, że ryzyko zakażenia kotów w województwie podkarpackim wzrasta dwukrotnie względem województwa podlaskiego, natomiast nie wiadomo o ile wzrasta ryzyko zakażenia względem województwa mazowieckiego.
- W publikacji nr 4 w czwartym akapicie dyskusji Doktorant porównuje uzyskane wyniki z wynikami badań z Francji, Niemiec i Holandii. To porównanie nie jest do końca właściwe. Natomiast jeśli się już pojawiło, w dyskusji powinny być zamieszczone dwie uwagi, gdyż bez nich czytelnikowi sugeruje się, że w Polsce jest znacznie więcej zakażonych kotów niż we Francji, Holandii czy Niemczech. Otóż wszystkie 3 cytowane

tutaj prace pochodzą z połowy lub końca lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku. Przynajmniej w dwóch z tych prac (Holandia i Niemcy) odsetek zakażeń określano na podstawie hodowli bakterii, a dopiero z tych hodowli izolowano DNA. Doktorant sam zwraca uwagę w swoich dwóch pierwszych publikacjach z tej dysertacji, że hodowla ma niską czułość ze względu na niski poziom bakteriemii. Zatem w moim przekonaniu wyniki tej części dysertacji nie powinny być porównywane z wynikami tamtych publikacji sprzed ponad 2 dekad bez uwag odnośnie różnic w metodyce oraz okresu z jakiego pochodzą cytowane tu publikacje.

- W badaniach, których wyniki opublikowano w pracy nr 5 wśród badanych parametrów biochemicznych wymieniono stężenie mocznika i kreatyniny oraz aktywność fosfatazy zasadowej i transaminaz (AST i ALT). Nie oznaczano natomiast stężenia białka całkowitego, albumin i mocnych elektrolitów jednowartościowych pomimo, że w artykule cytowanym w tej publikacji (pozycja nr 12) wśród zmian biochemicznych u kotów zakażonych *B. henselae* stwierdzono wzrost stężenia białka całkowitego oraz obniżenie stężenia sodu. W związku z tym moje pytanie do Doktoranta jest następujące: Dlaczego nie badano w surowicy kotów stężenia mocnych elektrolitów jednowartościowych czy białka?
- W publikacji nr 5 badania parazytologiczne wykonano jedynie u 3 kotów z biegunką. Wśród tych badań wymieniono również badanie kału metodą Baermanna. Badanie to powinno być wykonane przede wszystkim u kotów z podejrzeniem inwazji nicieni płucnych, w przypadku których biegunka występuje jedynie przy bardzo ciężkich inwazjach. Wskazaniem do tego badania powinna być raczej informacja czy kot jest wychodzący i ewentualnie informacja o możliwości zjedzenia żywiciela paratenicznego dla *Aelurostrongylus abstrusus*. Swoją drogą wymienione tu podstawowe badania parazytologiczne takie jak badanie kału metodą flotacji i badanie kału metodą Baermanna mogły zostać wykonane u wszystkich 24 kotów, gdyż nie podnoszą w znaczący sposób kosztów. W związku z powyższym moje pytanie do Doktoranta jest następujące: Dlaczego badanie parazytologiczne wykonano tylko u kotów z biegunką? Czy tylko te 3 koty były kotami wychodzącymi?
- W publikacji nr 5 w oparciu o uzyskane wyniki badane zwierzęta podzielono na 6 grup, które w dalszej części pracy nie są w żaden sposób ze sobą porównywane metodami statystycznymi. Moje pytanie do Doktoranta jest następujące: W jakim celu wprowadzono ten podział na grupy?
- W publikacji nr 5 znajdują się dwie tabele z wynikami badań krwi (badanie morfologiczne krwi oraz oznaczenia biochemiczne). W tych wynikach podano zakres wartości referencyjnych, średnią wraz z odchyleniem standardowym oraz liczbę zwierząt, u których stwierdzono wzrost lub obniżenie wartości dla danego parametru. W metodyce brakuje jednak informacji czy zbadano normalność rozkładu uzyskanych wyników. Przy niedużej liczbie przypadków jest prawdopodobne, że rozkład wyników nie był normalny. A w związku z tym Doktorant powinien w tabeli umieścić mediany wraz z percentylami zamiast średnich wraz z odchyleniem standardowym. Brak również wartości minimum i maximum, mimo, że wymieniono je w metodyce. W związku z tym moje pytanie do Doktoranta jest następujące: Czy rozkład wyników dla wszystkich parametrów z tabel 1 i 2 był normalny?

- Kolejne pytanie do Doktoranta odnośnie wyników zamieszczonych w tabelach jest następujące: Dlaczego w zasadzie w przypadku wszystkich oznaczonych parametrów w tabelach 1 i 2 średnia jest znacznie poniżej zakresu wartości referencyjnych, a mimo to liczba zwierząt z obniżoną lub podwyższoną wartością pomiaru jest niewielka? Wydaje się mało prawdopodobne czy wręcz niemożliwe, by średnia przykładowo dla liczby leukocytów u badanych 24 kotów wynosiła 0,45 przy zakresie wartości referencyjnych 5,5 do 19,5, gdy u 19 kotów liczba krwinek białych mieściła się w zakresie wartości prawidłowych (u 13 kotów) lub była podwyższona (u 6 kotów).
- Dalsze niezrozumiałe dla mnie wyniki w omawianych dwóch tabelach dotyczą odchylenia standardowego. Podane w tej kolumnie liczby wyglądają jak zakres wartości. Taki sposób zapisania odchylenia standardowego wygląda nietypowo, ale nie musi być błędem. Natomiast interpretując wyniki w ten sposób trudno zrozumieć dlaczego średnia w wielu przypadkach znajduje się poza zakresem tych wartości odchylenia standardowego. W przypadku odchylenia standardowego dla liczby płytek krwi zakres ten podano od wyższej wartości do niższej, a w przypadku stężenia mocznika zakres wynosić by miał od 5 do 5? Liczby te są dla mnie całkowicie niezrozumiałe. W związku z tym moje pytanie do Doktoranta jest następujące: Co oznaczają liczby podane w tabelach? Zarówno średnie jak i odchylenie standardowe.
- Kolejna uwaga do publikacji nr 5 odnosi się do rozpoznanej u 50 % kotów małopłytkowości. U kotów powszechne jest zjawisko rozpoznawania małopłytkowości rzekomej przez analizatory hematologiczne, zwłaszcza w przypadku zastosowania EDTA jako antykoagulantu. Wynika ona z agregacji płytek krwi in vitro przyczyniając się czasem również do rozpoznania leukocytozy rzekomej. U kotów małopłytkowość rzekoma może dotyczyć nawet od 50 do 70 % przypadków (Riond i wsp. 2015, doi: 10.1186/s12917-015-0510-x). Wykluczenie jej możliwe jest w oparciu o zastosowanie innego antykoagulantu (np. antykoagulanty cytrynianowe lub stabilny analog PGI_2 jakim jest Iloprost). Innym, pośrednim sposobem na orientacyjne oszacowanie liczby płytek krwi jest mikroskopowe badanie rozmazu krwi. W tym przypadku stwierdzona liczba płytek krwi może być obarczona błędem, jednakże pozwala na wykluczenie małopłytkowości rzekomej. W metodyce do publikacji nr 5 nie wspomniano jednak o mikroskopowym badaniu rozmazu krwi, a EDTA zastosowano jako antykoagulant. W związku z tym moje pytanie do Doktoranta jest następujące: Czy u badanych kotów zastosowano jakąś metodę do wykluczenia małopłytkowości rzekomej?
- Ostatnia uwaga do publikacji nr 5 również odnosi się do rozpoznanej małopłytkowości. Na stronie 209 publikacji nr 5 (czwarty akapit) podano informację, że również inni autorzy rozpoznawali małopłytkowość u kotów zakażonych *B. henselae* powołując się w tym miejscu na artykuł nr 12 z wykazu piśmiennictwa. Autorzy cytowanej pracy (nr 12) nie stwierdzili jednak małopłytkowości u zakażonych kotów. W cytowanej pracy w ogóle nie była badan liczba płytek we krwi u kotów. Autorzy tej publikacji spośród zmian hematologicznych wykazali jedynie limfocytozę u serododatnich zwierząt (tabela 2 w cytowanej publikacji nr 12). W związku z powyższym moje pytanie do Doktoranta jest następujące: Czy znana jest inna publikacja, w której rozpoznano małopłytkowość u kotów zakażonych *B. henselae*?
- Moja ostatnia uwaga krytyczna dotyczy wspomnianego już wcześniej celu pracy mającego polegać na charakterystyce molekularnej szczepów bakterii z rodzaju

Bartonella występujących u kotów w Polsce. Jak wspomniałem we wcześniejszej części recenzji, ani w publikacjach ani w autoreferacie nie znalazłem uzyskanej przez Doktoranta sekwencji DNA *B. henselae*, analizy filogenetycznej czy też określenia który ze szczepów *B. henselae* występuje u kotów w Polsce. W wynikach do publikacji nr 3 i 4 Doktorant stwierdza podobieństwo uzyskanych produktów PCR na poziomie 99-100 % do sekwencji znajdującej się w GenBanku pod numerem L38987.1 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/L38987.1), natomiast w publikacji nr 5 podobieństwo uzyskanego produktu PCR na poziomie 99-100 % do sekwencji uzyskanych we wcześniejszych badaniach powołując się w tym miejscu na artykuł nr 3 z wykazu piśmiennictwa. Ten cytowany artykuł (nr 3 z wykazu piśmiennictwa) jest opisem przypadku choroby kociego pazura u chłopca w wieku 2 lat i 9 miesięcy z gorączką i licznymi zmianami w wątrobie, u którego rozpoznanie zakażenia *B. henselae* postawiono w oparciu o badanie surowicy za pomocą testu immunofluorescencji pośredniej (doi: 10.4322/acr.2014.016). W tej cytowanej pracy nie wykonywano żadnych badań molekularnych. W związku z powyższym moje pytanie do Doktoranta jest następujące: Który szczep/genotyp *B. henselae* występuje u kotów w Polsce? Szczep Houston-1 czy Marseille? Według publikacji nr 2 z niniejszej dysertacji wynika, że dominującym w Europie szczepem/genotypem jest Marseille. Jednakże uzyskiwane przez Doktoranta wyniki wykazywały 99-100 % podobieństwa do wspomnianej wcześniej sekwencji nr L38987.1 (GenBank), która jest sekwencją genu syntazy cytrynianowej szczepu Houston-1. Szczep ten według publikacji nr 2 z niniejszej dysertacji jest szczepem dominującym w Azji.

Podsumowując, uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska lek. wet. Łukasza Mazurka porusza zagadnienia ważne z naukowego punktu widzenia. Są one również istotne dla praktykujących lekarzy weterynarii. Badania Doktoranta pokazują po raz pierwszy w Polsce jak duży jest odsetek zakażeń *B. henselae* u kotów w Polsce (a przynajmniej w jej wschodniej części). Ponadto, wskazuje jakie są czynniki ryzyka zakażenia kotów. Doktorant miał swój udział w projektowaniu i przeprowadzeniu badań. Pojawiły się tu pewne luki i błędy, o których wspomniałem w swoich uwagach krytycznych, a dotyczą głównie obróbki i interpretacji uzyskanych wyników oraz niewłaściwego cytowania innych autorów. Szczególnym przeoczeniem ze strony Doktoranta jest brak sekwencji uzyskanego produktu PCR i brak dalszej jej analizy. Należy jednak podkreślić, że nawet bez tego wyniku badań molekularnych praca jaką wykonał Doktorant była dużym przedsięwzięciem, a najważniejszym jej osiągnięciem jest określenie prewalencji zakażeń u kotów, określenie gatunku oraz czynników ryzyka.

Stwierdzam zatem, że rozprawa doktorska lek. wet. Łukasza Mazurka odpowiada warunkom określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki w zw. z art. 179 ust. 3 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r. poz. 1669).

dr hab. Wojciech Zygner