

Ocena rozprawy na stopień naukowy doktora nauk medycznych
w zakresie biologii medycznej
mgr biol. Łukasza Skrzypczaka
pt. „Występowanie stadiów dyspersyjnych *Giardia* i *Cryptosporidium* w wodzie z
fontann i kąpielisk”.

Kosmopolityczne pierwotniaki *Cryptosporidium* sp. i *Giardia* sp., pasożytujące w przewodach pokarmowych ludzi i zwierząt, mogą powodować wodnopochoodne epidemie u ludzi. Zakażenia mogą mieć różną postać kliniczną, lecz w pierwotnych zakażeniach epidemicznych dominuje biegunka. Infekcje tymi pasożytami są szczególnie niebezpieczne dla dzieci i osób z niedoborami immunologicznymi (w tym chorych na AIDS).

Wśród sześciu opisanych gatunków *Giardia*, *G. duodenalis* (syn. *Giardia intestinalis*, *Giardia lamblia*, Wielkouściec jelitowy, Ogoniastek jelitowy) występuje u człowieka w postaci cysty i trofozoitu. W Polsce za podstawową drogę szerzenia się tego pasożyta uważa się wodę. Do skażenia żywności mogą przyczyniać się owady (jak np. muchówki), które są w stanie mechanicznie przenieść inwazyjną cystę na powierzchnię produktu spożywczego, w tym mięsa. Częstość zakażenia w Polsce szacuje się na około 10% osób dorosłych i 25-50% dzieci. Postacią inwazyjną dla człowieka są cysty, które przeżywają w temp. pokojowej kilka dni, ale giną natychmiast w temp. powyżej 55°C. Ponieważ chlorowanie nie niszczy giardii, woda powierzchniowa przeznaczona do picia powinna być jodowana.

Pasożytem coraz częściej spotykanym u człowieka jest *Cryptosporidium hominis*. Do chwili obecnej opisano ponad 30 gatunków *Cryptosporidium*. Największe znaczenie u ludzi ma *C. hominis* (znany uprzednio jako *C. parvum*, genotyp 1), a nieco mniejszą *C. parvum* (znany uprzednio jako *C. parvum*, genotyp 2); częstość wykrywania w Polsce do 5% .

Rezerwuarem *Cryptosporidium* są ludzie, zwierzęta gospodarskie i domowe oraz wolno żyjące, a także laboratoryjne. Występowanie *Cryptosporidium* spp. opisano u psów i kotów, oraz u ptaków domowych i dzikich. Postacie inwazyjne (oocysty) powszechnie występują w wodach powierzchniowych (do 83%) , w których przeżywają przez dłuższy czas. Oocysty *Cryptosporidium* są odporne na czynniki środowiskowe i powszechnie stosowane środki dezynfekcyjne. Mogą przeżywać w środowisku z

zachowaniem inwazyjności przez kilka miesięcy. Mogą również przeżywać zamrażanie w temperaturze od -15°C do -20°C . Kryptosporydia przedostają się do wody na skutek jej zanieczyszczenia, zwłaszcza przez ścieki wprowadzane do niej w sposób zamierzony lub niezamierzony. Oczyszczanie ścieków nie zmniejsza ani liczby, ani żywotności stadiów dyspersyjnych pierwotniaków.

W dostępnym piśmiennictwie dotyczącym obszaru Polski można znaleźć tylko nieliczne dane o występowaniu stadiów dyspersyjnych *Giardia* i *Cryptosporidium* w zbiornikach wód powierzchniowych.

Podjęta więc przez mgr biol. Łukasza Skrzypczaka tematyka badawcza, dotycząca występowania postaci inwazyjnych *Giardia* i *Cryptosporidium* w wodzie fontann i kąpielisk miejskich, a także próba określenia potencjalnego ryzyka zarażenia ludzi tymi pasożytami jest istotna nie tylko z perspektywy biologii tych gatunków ale i zdrowia publicznego.

Przedstawiona do recenzji rozprawa ma układ tradycyjny, liczy 110 stron, zawiera 2 fotografie 6 rycin, 15 tabel i 224 pozycje piśmiennictwa oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Jest napisana językiem jasnym i zrozumiałym.

We wstępie Autor zwrócił uwagę na znaczenie środowiska wodnego, w tym otwartych zbiorników wodnych na terenach miejskich, w rozprzestrzenianiu się wielu gatunków pasożytów. W rozdziale tym mgr Skrzypczak zawarł też informacje o pasożytniczych pierwotniakach z rodzaju *Giardia* i *Cryptosporidium*, omawiając w pierwszym ich cechy wspólne, a następnie szczegółowo opisując biologię każdego z rodzajów. Każdy z opisów rodzajów ma wyraźną strukturę, zawierając następujące podrozdziały: rys historyczny, taksonomia, cykl rozwojowy i morfologia, oporność cyst na czynniki środowiskowe i środki dezynfekcyjne, diagnostyka, obraz kliniczny oraz epidemiologia. Ułatwia to czytającemu nie tylko porównanie znaczenia epidemicznego obu pasożytów, ale i zapoznanie się z możliwościami przerwania dróg transmisji. Cennym fragmentem wstępu jest podrozdział dotyczący metod wykrywania i identyfikacji stadiów dyspersyjnych badanych pasożytów w pobieranych próbach wody opisujący techniki zagęszczanie pobranych prób, metody oddzielania cyst lub oocyst od osadu a także metody wykrywania pierwotniaków przy użyciu mikroskopii świetlnej i immunofluorescencyjnej. W rozdziale tym opisano także metody molekularne (głównie odmiany reakcji łańcuchowej polimerazy - PCR). Skoncentrowanie się Autora na PCR było prawdopodobnie przyczyną, że pominął w omówieniu zalety metody cytometrii

przepływowowej, pozwalające wykryć od 2×10^2 cyst/ml badanego płynu (co może odpowiadać, po zagęszczeniu próbki, 1 cyste na 10 l pobranego materiału).

Głównymi celami pracy było wykrycie cyst *Giardia* i oocyst *Cryptosporidium* w próbach wody z fontann i kąpielisk leżących w obrębie metropolii poznańskiej i okolicach oraz określenie potencjalnego ryzyka zarażenia ludzi na podstawie identyfikacji gatunku i genotypu badanych pasożytów. Cele te zostały uzupełnione o cel szczegółowy, mający znaczenie metodyczne, jakim było zaprojektowanie starterów umożliwiających identyfikację genotypów A i B *Giardia duodenalis* inwazyjnych dla człowieka.

Rozdział "Materiały i metody" przedstawia schemat i metodykę przeprowadzonych badań. W pracy przebadano 285 prób wody (każdą o objętości 10 litrów) w kierunku obecności stadiów dyspersyjnych pasożytów. Większość prób pochodziło z fontann w Poznaniu (których nazwy i lokalizacje dokładnie podano), ale przebadano także próby ogólnodostępnych kąpielisk znajdujących się na terenie Poznania oraz z niestrzeżonego kąpieliska położonego nad jeziorem Rybno Wielkie.

Metodykę filtrowania prób i odzyskiwania osadu opisano dokładnie. Podano także sposoby wykrywania obecności dyspersyjnych stadiów *Giardia* i *Cryptosporidium* metodami mikroskopowymi i molekularnymi, a także metody bioinformatyczne użyte przy projektowaniu specyficznych starterów *G. duodenalis*, do składania sekwencji DNA oraz ich porównania z sekwencjami wcześniej opisanymi.

Metody mikroskopowe obejmowały ocenę świeżych preparatów podbarwionych roztworem IKI (roztwór jodu w jodku potasu), trwałych preparatów barwionych metodą Ziehl-Neelsena i preparatów barwionych znakowanymi fluoresceiną przeciwciałami monoklonalnymi przeciw *Cryptosporidium* i przeciw *Giardia*. Drobnym błędem w przedstawionej metodyce jest pomijanie stężeń roztworów użytych barwników.

W badaniach użyto technikę PCR, technikę PCR wewnętrznego (nested PCR), technikę PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR) Opisano techniki rozdziatu elektroforetycznego, wizualizacji i sekwencjonowanie ampikonów oraz test Light-Mix® Modular *Giardia* (Roche). DNA użyte do badań izolowano stosując komercyjne zestawy odczynników. Reakcję PCR i PCR wewnętrznego powadzono zgodnie z powszechnie przyjętym schematem. Technikę PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR) opisano szczegółowo, zwracając uwagę na projektowanie specyficznych starterów pozwalających odróżnić zbiory genotypów A i B *G. duodenalis*. W badaniach

użyto także fabrycznych testów opartych na RT-PCR firmy ROCHE. W opisach zabrakło pewnych danych, np., brak stężeń albuminy w podrozdziale „Mieszanka używana do PCR/nested PCR”, z kolei w podrozdziale „Warunki stosowane w technice PCR i nested PCR” nie ma informacji, jakie kryteria zastosowano przy ustalaniu warunków amplifikacji.

Uzyskane wyniki zostały dokładnie opisane i zilustrowane dwoma fotografiami z mikroskopu fluorescencyjnego, 5 tabelami i 4 rycinami. W około 10% przebadanych prób wody stwierdzono obecność pierwotniaków, w tym Giardia (3,5% prób) i Cryptosporidium (6,3%). W żadnej z prób nie wykryto jednoczesnego występowania obu pasożytów.

Stosując techniki mikroskopowe, tylko w przypadku użycia komercyjnego testu immunofluorescencji Merifluor Cryptosporidium/Giardia, wykryto obecność cyst Giardia w ośmiu próbach wody z fontann i dwóch próbach wody z kąpielisk oraz obecność oocyst Cryptosporidium w czternastu próbach wody z fontann i czterech próbach wody z kąpielisk.

Wykorzystując techniki biologii molekularnej, obecność DNA Giardia wykryto w próbach wody pobranych z 6 fontann, przy użyciu komercyjnego testu Light-Mix® Modular Giardia Kit (Roche Diagnostics). Stosując technikę real-time PCR uzyskano identyczne wyniki, przy czym stwierdzono występowanie DNA *G. duodenalis* z grupy genotypów B. Uzyskane wyniki były zgodne z rezultatami testu immunofluorescencyjnego. Żadna z technik biologii molekularnej nie pozwoliła na wykrycie Giardia w próbkach wody z kąpielisk.

Użycie komercyjnego testu immunofluorescencji bezpośredniej Merifluor Cryptosporidium/Giardia pozwoliło na wykrycie obecności oocyst Cryptosporidium w 14 próbach wody z fontann i czterech próbach wody z kąpielisk, czego nie udało się zaobserwować przy zastosowaniu innych testów mikroskopowych. Nie uzyskano natomiast produktów amplifikacji DNA Giardia stosując PCR, wewnętrzny PCR, PCR w czasie rzeczywistym oraz test molekularny LightMix® Modular Giardia.

Ocenę uzyskanych wyników utrudnia brak zestawienia skuteczności używanych metod do wykrywania obecności Giardia i Cryptosporidium w badanych próbach.

W dyskusji Autor odniósł się do danych literaturowych o występowaniu badanych pierwotniaków zarówno w Polsce, jak i na świecie. Przeanalizował także przydatność użytych metod diagnostycznych, w tym PCR z użyciem zaprojektowanych dla potrzeb pracy starterów. Ważnym fragmentem dyskusji jest ocena zagrożeń

epidemicznych, wynikających ze skażeń wody fontann i kąpielisk stadiami dyspersyjnymi Giardia i Cryptosporidium

Wnioski sformułowano poprawnie i odpowiadają w pełni założonym celom pracy.

Obszerne (liczące 224 publikacje) piśmiennictwo zostało dobrze dobrane.

Praca jest w pełni oryginalna, a zawarte w niej wyniki nie były dotychczas publikowane. Poruszane w niej zagadnienia dobrze wpisują się w aktualną problematykę ekologii miasta, a jej ważnym osiągnięciem jest wskazanie potencjalnych zagrożeń, jakie mogą stanowić odkryte zbiorniki wodne dla zdrowia mieszkańców dużych aglomeracji.

Uważam, że rozprawa spełnia warunki określone w art.13 ust.4 ustawy z dnia 18 marca 2011 r. o zmianie ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym, ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz o zmianie niektórych innych ustaw i wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego I Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie mgr biol. Łukasza Skrzypczaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o przyjęcie pracy z wyróżnieniem.



Prof. dr hab. Krzysztof Wiktorowicz

Poznań, 27 stycznia 2017