

Ocena pracy doktorskiej mgr Łukasza Skrzypczaka

Tytuł pracy: „Występowanie stadiów dyspersyjnych *Giardia* i *Cryptosporidium* w wodzie z fontann i kąpielisk”.

Pierwotniaki z rodzaju *Giardia* i *Cryptosporidium* wielokrotnie wywoływały poważne epidemie wśród ludzi w różnych regionach świata dlatego skupiają uwagę licznych parazytologów i epidemiologów. Inwazje tych pasożytów (giardioza i kryptosporidioza) najczęściej są nierozpoznawane, gdyż przebiegają bezobjawowo lecz mogą prowadzić do ciężkich zmian chorobowych, a nawet do zejść śmiertelnych. W Polsce ocenia się, że prewalencja giardiozy nie przekracza kilku procent (najczęściej chorują dzieci), a odsetek zarażonych ludzi *Cryptosporidium* jest nie znany (głównie z powodu trudności diagnostycznych). Dotąd nie odnotowano u nas wodnopochoodnych epidemii kryptosporidiozy i giardiozy, jednakże opisano ich ponad 300, w kilku krajach Europy i Ameryki, gdzie źródłem inwazji okazała się zanieczyszczona cystami lub oocystami woda akwenów rekreacyjnych (jezior, rzek, basenów kąpielowych, fontann).

Poszukiwanie cyst *Giardia* i oocyst *Cryptosporidium* w środowisku jest istotnym problemem w dociekaniach epidemiologicznych, tymczasem w Polsce jest to temat słabo rozpoznany. Najwięcej badań (choć i tak nie wiele) prowadzono w kierunku wykrywania cyst/oocyst tych pierwotniaków w odchodach zwierząt dzikich i domowych, stwierdzając zarażenia licznych gatunków żywicieli. Zaledwie kilka jest publikacji na temat występowania form dyspersyjnych *Giardia* i *Cryptosporidium* w akwenach naturalnych i sztucznych, natomiast ich obecności w wodach miejskich fontann dotąd w ogóle nie była badana. Wobec tego podjęty przez Doktoranta temat jest oryginalny i ważny, bowiem pozwala ocenić ryzyko zrażenia się tymi chorobotwórczymi pierwotniakami podczas wypoczynku czy rekreacji. Ponadto trzeba zauważyć, że badania te mają także inny wymiar – czysto poznawczy, gdyż są źródłem cennych informacji o lokalnej bioróżnorodności badanego obszaru (w tym genetycznego zróżnicowania wewnątrzgatunkowego).

Przedłożona do oceny praca doktorska ma układ klasyczny (wstęp, cel pracy, materiał i metody, dyskusja, wnioski, piśmiennictwo), a poszczególne jej rozdziały i podrozdziały są ułożone z logiczną konsekwencją co sprawia, że całość jest przyjazna dla czytelnika.

We wstępie, w części dotyczącej wprowadzenia, zawarto informacje o stanie badań w zakresie podjętego tematu badawczego - w kraju i na świecie. Następnie, w oparciu o aktualne piśmiennictwo, syntetycznie scharakteryzowano pasożyty *Giardia* i

Cryptosporidium opisując historię ich badań, taksonomię, biologię, diagnostykę, epidemiologię oraz stosowane metody wykrywania stadiów dyspersyjnych. Rozdział ten napisany jest poprawnie i bardzo interesująco. W kolejnym rozdziale, cel badań Doktorant stawia sobie 3 cele badawcze, które konsekwentnie w swojej pracy realizuje.

Rozdział metody zawiera dokładny opis stosowanych w terenie i w laboratorium technik i metod. Jest on tak napisany, że każdy, kto chciałby podobne badania wykonać miałby gotową receptę do wykorzystania (informacje dotyczące warunków pogodowych w czasie pobierania prób można było pominąć). Doktorant zebrał w sumie 285 prób (każda o objętości 10 litrów) czyli w sumie poddał analizie 2850 litrów wody! Badał ją w laboratorium na obecność cyst/oocyst pierwotniaków wszystkimi (czyli czterema) aktualnie dostępnymi na świecie metodami (od tradycyjnego mikroskopowania, do najnowszych technik molekularnych). W badaniach molekularnych opracował warunki amplifikacji, zaprojektował startery, opracował warunki reakcji dla tych starterów oraz przeprowadził analizy bioinformatyczne. Ten kompleks badań z pewnością był czasochłonny, pracochłonny, i wymagał precyzji działania ale przede wszystkim mógł to wykonać jedynie inteligentny i dociekliwy badacz.

Wyniki dotyczące obecności form dyspersyjnych *Giardia* oraz *Cryptosporidium* są bardzo interesujące. Okazało się, że przynajmniej połowa badanych fontann i jezior ma wody skażone chorobotwórczymi dla człowieka cystami/oocystami pierwotniaków (źródłami kryptosporidiozy i giardiozy). Cysty *Giardia* były obecne w 3,7% badanych prób pochodzących z miejskich fontann, a oocysty *Cryptosporidium* w 6,4% prób. W jeziorach i sztucznych kąpieliskach Poznania i okolic, pasożyty te stwierdzono odpowiednio w 3% i 6% prób. Oocysty *Cryptosporidium* stwierdzano częściej niż cysty *Giardia*, które z kolei były reprezentowane przez ewidentnie chorobotwórcze dla człowieka genotypy (A i B). Do wykrywania form dyspersyjnych obu gatunków najskuteczniejszą okazała się metoda immunofluorescencji, a w przypadku *Giardia* także najnowsze techniki molekularne. Wyniki opisane są klarownie i zawierają w opisie wszystkie dane liczbowe, jednakże zabrakło mi tabeli zbiorczej, która uwidoczniała by skuteczność stosowanych metod detekcji w odniesieniu do obu gatunków oraz ułatwiła by porównanie częstości ich wykrywania w badanych akwenach (zrobiłam ją sobie).

Dyskusja jest dojrzała. Doktorant polemizując z wynikami badań innych autorów sięgnął do obszernego piśmiennictwa, zwłaszcza zagranicznego, bowiem polskich opracowań z tego zakresu jest niewiele (wszystkie jednak zostały w pracy

uwzględnione). Omawiając swoje wyniki skoncentrował się głównie na znaczeniu epidemicznym wykrytych form dyspersyjnych *Giardia* i *Cryptosporidium* i trudno się temu dziwić. Podkreśla, że wody akwenów wykorzystywanych do rekreacji są zanieczyszczone tymi pasożytami, a w odniesieniu do miejskich fontann stwierdza (chyba trochę na wyrost) że stanowią one „poważne zagrożenie zdrowia publicznego” ale całkiem słusznie sugeruje aby w miarę możliwości zabezpieczać je przed takimi skażeniami. Bez wątpienia, wiedza o obecności patogenicznych form dyspersyjnych pierwotniaków w ogólnodostępnych akwenach jest cennym źródłem informacji, zwłaszcza dla epidemiologów i lekarzy, którzy borykają się diagnozowaniem kryptosporidiozy i giardiozy. Bezwzględnie słuszna jest sugestia aby w miarę możliwości podejmować działania prewencyjne w zakresie utrzymania higieny sanitarnej i czystości wody, która może być źródłem wodnopochoodnych chorób czy epidemii lecz, gdy mowa jest o poważnych zagrożeniach zdrowotnych, to chyba osąd można by nieco złagodzić. Wiadomo bowiem, że obecność patogenu w środowisku nie jest jednoznaczna z ekspozycją, a ekspozycja nie zawsze prowadzi do choroby pasożytniczej (częściej bywa niedokonana lub bezobjawowa) więc chyba nie ma powodu do nadmiernej trwogi. Ale być może mój pogląd w tej kwestii byłby inny, gdyby Autor zaznaczył (w Tab. 2 i 4) jakie zagęszczenie cyst/oocyst w wodach akwenów rekreacyjnych czy fontann, wiązało się z wywołaniem epidemii kryptosporidiozy i giardiozy w różnych lokalizacjach. Lecz odnosząc się do uzyskanych wyników chcę jeszcze zwrócić uwagę na ich znaczenie „pozamedyczne”. Monitorowanie występowania pasożytów w środowisku jest ważne dla przyrodników zainteresowanych wewnątrzgatunkowym, genetycznym zróżnicowaniem organizmów oraz zmianami jakościowymi i ilościowymi jakim podlega parazytofauna pod wpływem zmian klimatycznych, antropopresji itp., i te wyniki też są w tym zakresie istotne.

Doktorant z przeprowadzonych badań wyciągnął 3 wnioski, wskazując na: 1) istnienie potencjalnych zagrożeń zdrowotnych dla ludzi wynikających z obecności cyst/oocyst *Cryptosporidium* i *Giardia* w wodzie fontann oraz kąpielisk Poznania i okolic, 2) potrzebę podjęcia działań prewencyjnych skierowanych na ograniczenie transmisji tych pierwotniaków do ludzi oraz 3) użyteczność opracowanych przez siebie starterów do identyfikowania chorobotwórczych dla człowieka genotypów *Giardia*. To są bardzo konkretne i logiczne konkluzje lecz można, jak sądzę, je uzupełnić o skuteczność stosowanych metod detekcji cyst oraz o porównanie częstości występowania cyst/oocyst *Giardia* i *Cryptosporidium* w badanych wodach.

Podsumowanie: Recenzję tę wykonywałam z przyjemnością, gdyż praca jest przemyślana, starannie przygotowana i napisana poprawnym językiem. Jej wyniki są

oryginalne i interesujące; mają znaczenie poznawcze i aplikacyjne. W opracowaniu zawarto 15 tabel, 4 ryciny oraz 17 autorskich fotografii (w tym 4 mikrofotografie). Autor odwołał się do 224 pozycji piśmiennictwa, co świadczy, że jest dobrze odczytany w literaturze przedmiotu. Jak to zwykle bywa w dużych tekstach, i w tej pracy znalazły się drobne usterki, lecz w żadnej mierze nie umniejszają one wartości merytorycznej opracowania (np. na str. 11 należało by uzupełnić zdanie „podczas pływania do ust dostaje się ok. 100 ml. wody” -chyba w czasie jednego wdechu?; na str.12 stwierdza się, że stadia dyspersyjne były obecne nie tylko w wodzie wodociągowej ale także w wodach naturalnych zbiorników wód powierzchniowych. Chyba jest odwrotnie - bardziej dziwi skażenie wód uzdatnionych niż naturalnych? na str. 29 znalazł się zapis: „powstaje zygota, dzieli się bezpłciowo....” ; na str. 35 napisano: „pasożyt stanowi główne zagrożenie zdrowia publicznego dla światowej gospodarki wodnej”; Poznań nazywa się metropolią, raczej niestusznie, lepiej używać słowa aglomeracja).

W konkluzji stwierdzam, że Pan mgr Łukasz Skrzypczak przygotował nie tylko bardzo dobrą pracę doktorską ale także wykazał, że ma pasję i intuicję badawczą, że jest pracowity i dociekliwy, zna rozmaite techniki i metody badawcze oraz potrafi pisać teksty naukowe. Jego dysertacja pt. „Występowanie stadiów dyspersyjnych *Giardia* i *Cryptosporidium* w wodzie z fontann i kąpielisk” spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim i dlatego wnioskuje do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego I Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie Pana mgra Łukasza Skrzypczaka do publicznej obrony jego doktoratu. Uważam jednocześnie, że praca Jego zasługuje na wyróżnienie.

26. 01. 2017


Dr hab. prof. Hanna Mizgajska-Wiktor