

RECENZJA

dysertacji doktorskiej Pana **mgr. Krzysztofa Stojeckiego**

pt. „*Występowanie Giardia duodenalis u ludzi oraz wybranych gatunków zwierząt gospodarskich i wolno żyjących na terenie Pojezierza Łęczyńsko – Włodawskiego*”

wykonanej pod kierunkiem naukowym dr hab. Tomasza Cencka prof. nadzw.
w Zakładzie Parazytologii i Chorób Inwazyjnych
Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowy Instytut Badawczy
w Puławach

Giardioza (*giardiosis*) jest kosmopolityczną zoonozą pasożytniczą o etiologii pierwotniaczej, a czynnikiem patogennym są wiciowce z rodzaju *Giardia*. Kliniczny obraz inwazji dotyczy jelit cienkich i związany jest z długotrwałym stanem zapalnym tego odcinka przewodu pokarmowego, ze wszystkimi jego konsekwencjami. Inwazję stwierdza się powszechnie w wielu strefach klimatycznych, szczególnie w środowiskach o niskiej kulturze higienicznej. Mimo wielu możliwych źródeł zarażenia, giardioza postrzegana jest najczęściej jako inwazja wodo pochodna. Zarażenia związane są z wodą pitną lub korzystaniem z wody rekreacyjnej. Zaliczana do grupy chorób brudnych rąk. Jej występowanie warunkowane jest najczęściej dużym zagęszczeniem żywicieli, niskim standardem sanitarnym oraz brakiem kontroli jakości wody pitnej. W krajach rozwiniętych postrzegana jest również jako pasożytoza związana z podróżą. Wiciowce z rodzaju *Giardia* są pasożytami poliksenicznymi, występującymi u wielu gatunków żywicieli. Fakt ten sprzyja kontaminacji środowiska formami inwazyjnymi i odpowiedzialny jest za występowanie zagrożeń w bardzo różnych okolicznościach. Rozwój cywilizacyjny oraz higienizacja życia w opinii wielu epidemiologów eliminują ryzyko zarażeń. Jednak z uwagi na czynniki środowiskowe inwazji problem giardiozy jest ciągle aktualny, wymaga badań i stałego monitorowania. Aktualność problemu wynika również z ciągłego doskonalenia warsztatu badawczego. Udoskonalenie

i popularyzacja badań molekularnych umożliwiła parazytologom weryfikację dotychczasowych poglądów, dotyczących bioróżnorodności wcześniej opisywanych taksonów. Precyzyjna analiza sekwencji rozstrzyga bezwzględnie podobieństwa i różnice, również w zakresie możliwości zarażenia i chorobotwórczości dla poszczególnych gatunków żywicieli. Dlatego badania, których celem jest poznanie nowych uwarunkowań inwazjiologicznych są szczególnie cenne, ponieważ służą w konsekwencji ochronie zdrowia publicznego. Wybór tematu pracy będącej podstawą dysertacji doktorskiej jest w mojej opinii szczególnie trafny i w pełni uzasadniony.

Dysertacja doktorska napisana jest zgodnie z aktualnymi wymogami, określonymi dla naukowych prac doświadczalnych, stanowiących przedmiot rozpraw doktorskich. Praca liczy 94 strony, w tym stronę tytułową, spis treści 3 strony, wykaz użytych skrótów -1 strona, obszerny wstęp liczący -29 stron, cel badań -1 strona, materiał i metody badań -11stron, wyniki -15 stron, uzupełnione dokumentacją w postaci 4 rycin i 6 tabel, dyskusja -19 stron, wnioski -1 strona, streszczenie w języku polskim -2 strony, streszczenie w języku angielskim - 2 strony oraz wykaz piśmiennictwa obejmujący -222 pozycje, -19 stron.

W obszernym wstępie stanowiącym teoretyczne uzasadnienie podjętych badań. Doktorant omawia zagadnienia związane z inwazją *Giardia duodenalis* oraz przytacza aktualny stan wiedzy dotyczący giardiozy u ludzi i zwierząt. W pierwszej części autor prezentuje bogaty rys historyczny, związany z rozpoznaniem i opisaniem pierwotniaka oraz ewaluację poglądów dotyczących systematyki i nazewnictwa od XVII wieku aż do czasów współczesnych. Kolejna część wstępu poświęcona jest morfologii i biologii pasożyta w oparciu o najnowsze piśmiennictwo światowe. Autor posiłkuje się w tym przejrzystą grafiką komputerową. Obszerna część wstępu poświęcona jest analizie klinicznych uwarunkowań giardiozy u ludzi i zwierząt. Doktorant rozważa źródła i drogi zarażenia, cytując najczęstsze okoliczności zarażeń. Dodatkowo przedstawia aktualne poglądy dotyczące patogenezы inwazji. Dokonuje również przeglądu piśmiennictwa odnoszącego się do prewalencji *Giardia duodenalis* u zwierząt gospodarskich i towarzyszących. Dane te przedstawione są w formie trzech obszernych tabel. W wyodrębnionej części tego rozdziału Doktorant analizuje dane dotyczące giardiozy u ludzi. Przytacza iż problem ten dotyka 280 mln. rocznie w skali świata. Kolejna część wstępu poświęcana jest analizie współczesnych możliwości diagnostycznych giardiozy u ludzi i zwierząt. Autor szczegółowo opisuje możliwości diagnostyki mikroskopowej i serologicznej. Szczególnie wiele miejsca poświęca diagnostyce molekularnej wskazując możliwe do wykorzystania markery genetyczne.

Niezmiernie ważnym aspektem profilaktyki giardiozy jest również analiza kontaminacji środowiska cystami pasożyta. W tym aspekcie Autor opisuje możliwości badania próbek środowiskowych. Wszystkie rozważania udokumentowane są odpowiednimi pozycjami piśmiennictwa. Reasumując, stwierdzam, że tezy i założenia ujęte we „Wstępie” recenzowanej pracy stanowią gruntowne teoretyczne uzasadnienie badań będących przedmiotem dysertacji doktorskiej.

W następnej części pracy Autor przedstawia 4 cele badań. Zostały one zdefiniowane w sposób jasny i zrozumiały, a postawienie ich znalazło uzasadnienie w rozważaniach zawartych we wstępie pracy doktorskiej.

W rozdziale Materiał i metody przedstawiono przebieg procesu badawczego, będącego przedmiotem dysertacji.

W odniesieniu do I celu pracy dotyczącego prewalencji inwazji u ludzi i zwierząt, materiałem do badań były 583 próby kału ludzkiego, zwierząt gospodarskich, towarzyszących i wolno żyjących, pochodzących z rejonu Pojezierza Łęczyńsko-Włodawskiego, w tym 100 prób od ludzi, 86 od bydła, 10 od koni, 82 od świń, 60 od psów, 27 od dzików, 28 od jeleni, 21 od lisów, 23 od łosi, 48 od saren, 7 od wilków, 4 od zajęcy i po jednej próbie od wydry, borsuka, łasicowatych, i kunowatych. W celu izolacji cyst *Giardia* z próbek kału zastosowano metodę flotacyjno-sedymentacyjną z użyciem Percollu. Natomiast w celu identyfikacji cyst wykorzystano nowoczesną technikę opartą na metodzie fluorescencji bezpośredniej (Direct Fluorescent Assay - DFA). W badaniach posłużono się zestawem komercyjnym *Giardi-a-Glo Comprehensive Kit* (Waterborne, Inc, USA.). Jako alternatywną metodę identyfikacji cyst zastosowano technikę molekularną. Jej kolejne fazy to dezintegracja cyst, izolacja DNA przy użyciu testu komercyjnego *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen), amplifikacja fragmentu genu *β-giardina* (nested PCR), obrazowanie produktów PCR drogą elektroforezy. Ostateczna analiza gatunku oraz wykazanie podobieństw genotypowych między uzyskanymi izolatami a także izolatami referencyjnymi wykazano przez sekwencjonowanie i analizę filogenetyczną, w oparciu o programy bioinformatyczne jak: *BioEdit v7.2.5*, *ClustalW*, *RaxML 8.0*, *Dendroscope 3*, *Mega 6*.

W nawiązaniu do II celu badań, jakim było wykazanie skali kontaminacji środowiska Pojezierza Łęczyńsko-Włodawskiego cystami *Giardia spp.*, materiałem do badań były próbki wody pobrane z 13 jezior pojezierza z okolic kąpielisk oraz 12 próbek wody pochodzącej z rowów melioracyjnych zlokalizowanych na pastwiskach. Dodatkowo badano osady ściekowe odwodnione oraz ścieki oczyszczone z trzech oczyszczalni oraz próbki pofermentu z dwu biogazowni zlokalizowanych na terenie Pojezierza Łęczyńsko-Włodawskiego.

Badano również próbki gleby z siedmiu pastwisk na których prowadzono wypas bydła i owiec. W celu izolacji cyst *Giardia* próbki wody poddano filtracji i immunomagnetycznej separacji z użyciem zestawu komercyjnego Dynabeads GC-Combo (Life Technologies). Izolację cyst z próbek osadów ściekowych, ścieku oczyszczonego, pofermentu z biogazowni oraz gleby przeprowadzono metodą sedymentacyjno-flotacyjną z użyciem nasyconego roztworu azotanu sodu. Identyfikację cyst dokonano podobnie jak w badaniach próbek kału metodami fluorescencji bezpośredniej i inżynierii genetycznej (PCR wraz sekwencjonowaniem).

Wielkim atutem recenzowanej pracy jest zastosowany szeroki wachlarz nowoczesnych technik diagnostycznych dedykowanych *Giardia spp.*, pozwalających na skuteczne i pewne rozpoznanie inwazji. Na uwagę zasługuje szczególnie odczyn fluorescencji bezpośredniej, pozwalający na wizualizację pasożyta w badanej próbce.

Prace wzbogacają dodatkowo szerokie badania genetyczne, umożliwiające szczegółowe porównania fragmentów genomu, a tym samym dokładną analizę populacji pasożytów oraz ich filogenezy. Doktorant z dużą swobodą posługuje się prawidłowo dobranymi technikami molekularnymi w celu osiągnięcia założonych celów rozprawy doktorskiej. Świadczy to o szerokiej wiedzy Doktoranta, jak również umiejętności dobrania odpowiednich narzędzi niezbędnych do zrealizowania planów badawczych.

W rozdziale poświęconym wynikom pracy, poczynając od etapu prezentowania skali prewalencji, Doktorant w sposób rzeczowy i zrozumiały przedstawia najistotniejsze z punktu widzenia prezentowanej rozprawy rezultaty badań. Rozdział ten możemy podzielić na trzy zasadnicze części. W pierwszej, poświęconej ekstensywności inwazji dotyczącej wielu gatunków żywicieli, Doktorant wykazał relatywnie niski odsetek zarażonych ludzi – 2%, przy jednocześnie wysokiej prewalencji u zwierząt gospodarskich (22,1%). Gatunkami o największej ekstensywności były świnie i owce. Zależność ta została potwierdzona zarówno w metodzie immunofluorescencji jak i PCR. Analizując prewalencję inwazji u zwierząt towarzyszących i wolno żyjących, wykazano zarażenie na poziomie 19% i 7 %, co rzuca nowe światło na skalę występowania zagrożeń zarówno w środowisku synantropijnym jak i sylwatyicznym. Gatunkami u których najczęściej stwierdzano pasożyty były psy , wilki , lisy oraz dziki. W drugiej części, poświęconej kontaminacji środowiska, cysty znajdowano najczęściej w próbkach pochodzących z oczyszczalni ścieków oraz w próbkach pofermentu z biogazowni. Obecność cyst wykazano w wodzie z jezior w 7% prób . Natomiast próbki gleby z pastwisk były wolne od zanieczyszczenia *Giardia*. Interesującym jest, iż w próbkach pochodzących z oczyszczalni ścieków oraz biogazowni, mimo wykrycia znaczącej

konatminacji cystami metodą fluorescencji bezpośredniej, metodami molekularnymi nie wykryto DNA pasożyta. Kolejna, bardzo interesująca część, poświęcona analizie genetycznej izolatów od ludzi i zwierząt wykazała ich przynależność do typu A, co potwierdza zoonotyczny charakter inwazji. Również cechy genetyczne innych izolatów pochodzących od zwierząt, zwłaszcza wolnożyjących, potwierdzają ich zaraźliwość dla ludzi -Typ genetyczny B. Analiza filogenetyczna wykazała, że uzyskane sekwencje tworzą 4 klady, które są powiązane z typami genetycznymi. Poza zoonotycznymi Typami A oraz B, stwierdzanymi najczęściej, wykryto także typy E i D, nie stanowiące zagrożenia dla człowieka. Pochodziły one głównie od zwierząt gospodarskich i wolno żyjących. Jako najczęściej stwierdzany typ genetyczny, wykazano zoonotyczny Typ B. Jego obecność u zwierząt gospodarskich, towarzyszących, wolnożyjących oraz w próbach środowiskowych potwierdza, iż giardioza jest znacząca dla człowieka zoonozą. Podobieństwa filogenetyczne dotyczące badanych izolatów, zostały porównane z sekwencjami izolatów referencyjnych w postaci drzew filogenetycznych. Poszczególne sekwencje uzyskane z prób pochodzących od różnych grup żywicieli oraz prób środowiskowych (próby wody) zostały zgłoszone do bazy GenBank i uzyskały numery akcesyjne. Opisowa część wyników badań została uzupełniona o liczne przejrzyste ryciny i tabele, które wzbogacają dysertację i ułatwiają porównania uzyskanych przez Doktoranta wyników.

W rozdziale „Dyskusja” Autor w sposób dojrzały i wyczerpujący skonfrontował wyniki własnych badań z bogatym i trafnie dobranym piśmiennictwem. Należy zaznaczyć, że są to w dużej mierze publikacje obcojęzyczne z ostatniego dziesięciolecia. W ten sposób Doktorant udowadnia dobrą znajomość problematyki, a także umiejętność przedstawienia obszernego materiału w formie zwartej i logicznej. Podchodzi On przy tym w sposób krytyczny zarówno do osiągnięć własnych badań jak i danych piśmiennictwa. Nie waha się przy tym przed prezentowaniem własnych poglądów odnośnie badanych zjawisk, dotyczących inwazjologii giardiozy. Omawiana dyskusja dodatkowo wzbogaca wartość pracy i świadczy o dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktoranta.

Na podstawie przeprowadzonych badań Autor pracy wysunął 8 interesujących wniosków, odnoszących się do celów badań i znajdujących swe uzasadnienie w uzyskanych wynikach doświadczenia.

Pracę oceniam bardzo wysoko i nie wnoszę żadnych zastrzeżeń do wartości merytorycznej pracy. Dysertacja jest napisana w sposób zrozumiały. Obszerne opisy i wyjaśnienia oraz podziały na podrozdziały ułatwiają percepcję, niekiedy trudnych zagadnień, omawianych przy tym w bardzo fachowy sposób.

Z obowiązku recenzenta pragnę również zwrócić uwagę na niewielkie nieścisłości językowe, redakcyjne i techniczne dostrzeżone w pracy np.:

W tytule pracy „Występowanie *Giardia duodenalis* u ludzi oraz wybranych gatunków zwierząt gospodarskich i wolno żyjących na terenie Pojezierza Łęczyńsko – Włodawskiego”, nie uwzględniono zwierząt towarzyszących które były obiektem badań

W rozdziale Materiał i Metody p 3.2.2 oraz dwukrotnie w streszczeniu str. 72 niezbyt trafnie użyto pojęcia „zwierzęta hodowlane”. W odniesieniu do cytowanych gatunków proponuję zastąpić je określeniem -zwierzęta gospodarskie, zwrot -zwierzęta hodowlane jest pojęciem znacznie szerszym.

W tym samym rozdziale p 3.5.2.1 tytuł podrozdziału określono jako „Flotacja”. Analizując opisaną metodę sugeruję zastosować określenie jako metoda sedymentacyjno-flotacyjna. Pierwszy jej etap to sedymentacja wspomagana wirowaniem. Dodatkowo w opisie użyto określenia „ próbki... wirowano przez 15 min z siłą 1100g” . Sugeruje zamiast skrótu myślowego użyć określenia -siła odśrodkowa 1100g . Dodatkowo Autor opisując metodę, nie powołuje się na jakąkolwiek pozycje piśmiennictwa. Czy jest to autorskie opracowanie metodyczne?. W takim układzie proponuję sygnować ją jako metoda własna. W przeciwnym wypadku jest to modyfikacja własna innej metody i należy powołać się na jej źródło.

W rozdziale Wyniki p 4.3. przeoczono wyniki badania wody pochodzącej z rowów melioracyjnych w liczbie 12 prób, bądź błędnie je określono jako wodę z „ pozostałych 12 jezior”

W rozdziale dyskusja str 55. W zdaniu „ Metody te pozwoliły m.in. na pełniejsze poznanie dróg zarażenia człowieka.... ”. Pojęcie -droga zarażenia –w parazytologii odnosi się do drogi wnikania formy inwazyjnej pasożyta do organizmu żywiciela. W przypadku giardiozy zawsze jest to droga oralna. Autor prawdopodobnie miał na myśli drogi szerzenia się inwazji w populacji żywicieli w kontekście źródła zarażenia .

Niezbyt jasne w mojej opinii jest również sformułowanie użyte w dyskusji str 57 „Występowanie objawów klinicznych jest bowiem uzależnione m.in. od intensywności i rodzaju inwazji oraz od cech osobniczych żywiciela.” W moim wyobrażeniu to rodzaj inwazji uzależniony jest od wystąpienia lub braku objawów klinicznych.

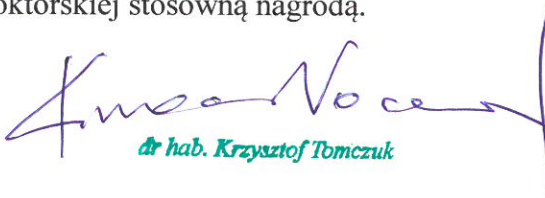
Powyższe uwagi nie umniejszają wartości naukowej ocenianej dysertacji, mają głównie charakter uwag redakcyjnych, z nadzieją, że zostaną one uwzględnione przed przekazaniem jej do opublikowania.

Końcowa ocena pracy

Pracę doktorską Pana mgr. Krzysztofa Stojeckiego oceniam bardzo wysoko. Doktorant w pełni zrealizował postawione w założeniach pracy cele i wysunął trafne wnioski. Włożył wiele wysiłku w opracowanie strony graficznej pracy, podnoszącej znacznie wartość merytoryczną pracy doktorskiej. Zarówno dobór metod badawczych jak też interpretacja wyników badań własnych, w konfrontacji z licznie cytowanymi pracami innych autorów świadczą o dojrzałości naukowej Autora. Rozprawa doktorska mgr. Krzysztofa Stojeckiego wnosi nowe, oryginalne wartości poznawcze i poszerza wiedzę na temat możliwych dróg szerzenia się giardiozy. Wykazuje znaczną różnorodność genetyczną badanych izolatów, przez co różnicuje zagrożenie zarażeniem w kontekście różnych żywicieli. Dodatkowo efekty tej pracy, mogą przyczynić się do opracowania nowych lokalnych strategii profilaktyki i zwalczania giardiozy u ludzi i zwierząt.

Przedstawiona do oceny praca jest samodzielnym, oryginalnym i wartościowym dorobkiem naukowym Pana mgr. Krzysztofa Stojeckiego, o dużych wartościach naukowo-poznawczych oraz aplikacyjnych i moim zdaniem odpowiada w pełni warunkom określonym w art. 13 Ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U. Nr 65, poz. 595), a także zapisom Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22 września 2011 roku w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz postępowaniu o nadanie tytułu profesora. Biorąc powyższe pod uwagę przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie mgr. Krzysztofa Stojeckiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Bardzo wysoka ocena pracy, uwzględniająca przede wszystkim innowacyjność zastosowanych metod, aktualność tematu problematyki badawczej oraz rzetelność badań, zredagowanych w przedstawionej dysertacji, upoważnia mnie do wystąpienia do Wysokiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach o wyróżnienie pracy doktorskiej stosowną nagrodą.


dr hab. Krzysztof Tomczuk