

Prof. dr hab. Aleksander W. Demiaszkiewicz
Pracownia Parazytoz Zwierząt Dzikich
Instytut Parazytologii im. W. Stefańskiego PAN

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Krzysztofa Stojckiego pt. "Występowanie *Giardia duodenalis* u ludzi oraz wybranych gatunków zwierząt gospodarskich i wolno żyjących na terenie Pojezierza Łęczyńsko-Włodawskiego"

Przedmiotem ocenianej rozprawy są pierwotniaki z rodzaju *Giardia*, szeroko rozprzestrzenione pasożyty ludzi i zwierząt. *Giardia duodenalis* jest najwcześniej, bo już w XVII wieku odkrytym pasożytniczym pierwotniakiem, wywołującym u ludzi i zwierząt najbardziej rozpowszechnione choroby układu pokarmowego. Pierwotniak ten jest potencjalnym patogenem zoonotycznym, ponieważ niektóre jego genotypy występują zarówno u zwierząt i ludzi i mogą być między nimi przenoszone. Dotychczasowe badania molekularne pozwoliły na identyfikację 8 genotypów pasożyta, które są morfologicznie nierozróżnialne. Jakkolwiek badania nad występowaniem tego pierwotniaka były prowadzone w kilku ośrodkach badawczych w kraju, były to w większości przypadków prace przyczynkowe, ograniczające się do rejestracji pasożyta u ludzi, pojedynczych gatunków zwierząt lub w środowisku. Dlatego też z uznaniem należy przyjąć wybór tematu rozprawy doktorskiej i podjęcie przez mgr Krzysztofa Stojckiego badań nad występowaniem pierwotniaków *Giardia duodenalis* u ludzi oraz zwierząt gospodarskich i wolno żyjących na terenie Pojezierza Łęczyńsko-Włodawskiego, rejonu charakteryzującego się warunkami sprzyjającymi szerzeniu się inwazji. Są to nieliczne w skali światowej i pierwsze

w Polsce tak kompleksowe badania nad tym pasożytem, dotyczące zarówno ludzi, wielu gatunków zwierząt gospodarskich i wolno żyjących jak również występowania pasożyta w środowisku na ściśle określonym terenie. Wyniki tych badań są cennym uzupełnieniem luk istniejących w dotychczasowej wiedzy dotyczącej epidemiologii tego pierwotniaka.

Recenzowana rozprawa została przygotowana bardzo starannie, posiada układ typowy dla rozpraw doktorskich, liczy ogółem 94 strony, zawiera 6 rozdziałów, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz obszerny spis literatury. Ponadto praca zaopatrzona jest w wykaz stosowanych skrótów. Ryciny, rysunki i tabele umieszczone są we właściwych miejscach w tekście, co ułatwia czytanie rozprawy.

Pracę otwiera obszerny „Wstęp” liczący 19 stron, w którym Autor przedstawił charakterystykę przedmiotu badań – pierwotniaków z rodzaju *Giardia* ze szczególnym uwzględnieniem *Giardia duodenalis*, ich systematykę, morfologię, i cykl rozwojowy, źródła i drogi zarażenia oraz zagrożenie parazytozą ludzi i zwierząt, patogenezę inwazji, a także prewalencję pasożyta u zwierząt i ludzi na świecie, na podstawie piśmiennictwa. Omówił także diagnostykę giardiozy, która zmieniała się wraz z rozwojem i wprowadzaniem nowych metod badawczych.

W drugim, jednostronicowym rozdziale Autor sformułował cele pracy. Celem przeprowadzonych badań było określenie częstości występowania pierwotniaków *Giardia* spp. u ludzi i zwierząt na terenie Pojezierza Łęczyńsko-Włodawskiego oraz określenie występowania pasożytów w środowisku (w wodzie z jezior, rowów melioracyjnych, w glebie, w ściekach oczyszczonych, osadach ściekowych i pofermencie z biogazowni). Ważnymi celami rozprawy były także analiza molekularna wyizolowanych szczepów *Giardia* spp. oraz identyfikacja kręgu żywicielskiego dla poszczególnych genotypów z uwzględnieniem potencjalnego zagrożenia zdrowia ludzi. W świetle przedstawionych we wstępie danych podjęcie tych badań było w pełni

uzasadnione. Na uznanie zasługuje szeroki zakres planowanych badań i ich kompleksowy charakter.

Trzeci rozdział „Materiał i metody” obejmuje 11 stron. W rozdziale tym Autor opisuje rejon badań oraz omawia pochodzenie materiału badawczego w postaci próbek kału i metody pobierania próbek środowiskowych. Łącznie badaniom poddano 583 próbki kału pochodzące od ludzi, 5 gatunków zwierząt gospodarskich i 11 gatunków zwierząt wolno żyjących. Ponadto zbadano próbki wody z 13 jezior i 12 rowów melioracyjnych, próbki osadów i ściekowych i ścieku oczyszczonego z 3 oczyszczalni, próbki pofermentu z 2 biogazowni i próbki gleby z okolic 7 oddalonych od siebie pastwisk. Jest to bardzo bogaty materiał badawczy, pozwalający na wykonanie szerokich, kompleksowych badań. Autor opisuje również mikroskopowe metody badania próbek: metodę flotacyjno-sedymentacyjną z użyciem Percollu i odczyn fluorescencji bezpośredniej (DFA) a także szczegółowo omawia metody molekularne: izolację i ekstrakcję DNA, amplifikację fragmentu genu *β-giardina* (nested PCR), elektroforezę, oczyszczanie produktów PCR, sekwencjonowanie i analizę filogenetyczną.

Dobór metod zastosowanych w ocenianej pracy jest właściwy i nie budzi zastrzeżeń.

Zasadniczą część rozprawy stanowi rozdział czwarty “Wyniki” o objętości 15 stron. Pierwotniaki z rodzaju *Giardia* stwierdził Autor w 22,1% próbek kału zwierząt hodowlanych. U tych zwierząt najwyższą prevalencję pasożyta zaobserwował w próbkach kału trzody chlewnej (29,3%). U innych gatunków zwierząt hodowlanych prevalencja ta wahała się od 10 do 22%. Genotypowanie uzyskanych izolatów pozwoliło na wykrycie genotypów A i E *G. duodenalis*, a znacznie rzadziej serotypu E. U zwierząt wolno żyjących *Giardia* spp. występowała w 21% próbek kału. Najwyższą prevalencję pierwotniaka stwierdzono u dzików (40,7%), wilków (28,6%) i saren (22,9%), a nieco niższą u lisów (19%), jeleni (17,9%) i łosi (17,4%). W grupie zwierząt

wolno żyjących wykryto obecność genotypu B *G. duodenalis*, a jedynie u wilków genotypu D. Obecność pierwotniaka stwierdzono jedynie u 2 osób (2%), a uzyskane izolaty zaliczono do genotypu A identycznego z wykrytym w części próbek pochodzących od owiec, psów i bydła. Przeprowadzone badania środowiskowe pozwoliły na wykrycie *Giardia* spp. w 7,7% próbek wody z jeziora, i w 100% próbek pochodzących z osadów ściekowych, ścieku oczyszczonego i pofermentu z biogazowni. W wyniku analizy filogenetycznej pierwotniaków z rodzaju *Giardia* Autor wykazał duże zróżnicowanie genetyczne uzyskanych izolatów, a także znaczną odrębność genetyczną izolatów uzyskanych od ludzi, zwierząt hodowlanych i wolno żyjących, co wskazuje na to, że na terenie badań w minimalnym stopniu dochodzi do krążenia *G. duodenalis* między środowiskiem sylwatyicznym a synantropijnym.

W rozdziale piątym „Dyskusja” liczącym 16 stron Autor w sposób dojrzały i zrównoważony porównał i przedyskutował swoje wyniki z danymi pochodzącymi z publikacji innych badaczy.

W rozdziale szóstym „Wnioski” Autor sformułował najważniejsze stwierdzenia i wnioski logicznie wypływające z treści rozprawy, jeszcze raz podkreślające jej wartość. Rozprawę kończą streszczenia w wersji polskiej i angielskiej oraz obszerny spis literatury przedmiotu obejmujący 222 publikacje. Wykorzystanie tak licznych pozycji piśmiennictwa dowodzi, że Autor bardzo dobrze opanował teoretyczne podstawy zagadnienia.

Do ważnych wyników rozprawy należy stwierdzenie, że inwazje *G. duodenalis* występują powszechnie u zwierząt hodowlanych, towarzyszących oraz wolno żyjących na terenie Pojezierza Łęczyńsko-Włodawskiego i charakteryzują się dużą zmiennością genetyczną. Cenna z metodycznego punktu widzenia jest również uwaga, że w badaniach nad występowaniem pierwotniaków z rodzaju *Giardia* należy jednocześnie stosować metody mikroskopowe i molekularne, co znacznie zwiększa dokładność uzyskanych wyników. Doniosłym osiągnięciem było ustalenie, że na terenie badań

dominującymi typami *G. duodenalis* są u zwierząt hodowlanych typy A i E, a u zwierząt wolno żyjących typ B oraz stwierdzenie, że genotyp A zarejestrowany u owiec, bydła i psów może wywoływać również inwazje u ludzi. Ważne jest także wykazanie, że na terenie jednego gospodarstwa możliwe są inwazje u różnych gatunków żywicieli wywoływane przez jeden genotyp pasożyta, jak również inwazje u jednego gatunku zwierząt wywoływane przez różne genotypy. Niezmiernie interesujące jest stwierdzenie w wyniku przeprowadzonej analizy filogenetycznej, że transmisja pierwotniaków pomiędzy żywicielami ze środowiska synantropijnego i sylwatyicznego ma bardzo ograniczony zakres. Bardzo istotne jest także potwierdzenie możliwości rozprzestrzeniania się form dyspersyjnych pasożyta przez nawozowe wykorzystanie osadów ściekowych i odpadów z biogazowni.

Wyniki te mają duży aspekt praktyczny w kontekście epidemiologii i profilaktyki giardiozy u ludzi i zwierząt.

Pod względem formalnym rozprawa mgr Krzysztofa Stojckiego nie budzi zastrzeżeń. Należy uznać za w pełni prawidłowe zarówno układ treści, wyciągnięcie wniosków w oparciu o przedstawioną dokumentację, a także wykorzystanie źródeł. Należy podkreślić, że oceniana rozprawa napisana jest jasno i przejrzysto, dobrym językiem.

Rozprawę Doktorant opracowała sumiennie i wnikliwie w oparciu o prawidłową metodykę badań. Należy uznać, że wytyczone cele pracy zostały osiągnięte w stopniu w pełni zadowalającym.

Recenzowana dysertacja wykazując staranność wykonanych badań, samodzielność obserwacji i wnioskowania, a zatem pełne przygotowanie i dojrzałość jej Autora do prowadzenia prac naukowych, pod każdym względem odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim.

Dlatego też z pełnym przekonaniem przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu

Badawczego wniosek o dopuszczenie mgr Krzysztofa Stojeckiego do dalszych, przewidzianych ustawą etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę nowatorstwo opiniowanych badań, doskonałe opracowanie rozprawy i wagę uzyskanych wyników, proponuję wyróżnienie tej rozprawy i przyznanie mgr Krzysztofowi Stojeckiemu nagrody.

Warszawa, 18.01.2016 r.



Prof. dr hab. Aleksander W. Demiaszkiewicz