

## Streszczenie

*Cryptosporidium* spp. (*Cryptosporidium*) jest oportunistycznym pasożytniczym patogenem wykazującym predylekcję do komórek nabłonka układu pokarmowego i oddechowego większości kręgowców i bezkręgowców. Jak dotąd, w obrębie rodzaju *Cryptosporidium*, u ludzi opisano występowanie 20 gatunków i genotypów. Niemniej jednak, większość zarażeń o znaczeniu klinicznym spowodowana jest przez *C. hominis* i *C. parvum*. Zazwyczaj *Cryptosporidium* kojarzony jest jako czynnik etiologiczny chronicznych biegunek na całym świecie. U osób immunokompetentnych inwazja zwykle jest ograniczona do układu pokarmowego, powodując samoistnie ustępujące biegunki, lub występuje w postaci asymptomaticznej, dlatego też osoby te rzadko są uwzględniane wśród grup ryzyka rozwoju kryptosporydiozy. Objawowe zarażenia tym patogenem dotyczą natomiast głównie osób z zaburzeniami układu odpornościowego, u których dochodzi do rozwoju przewlekłej kryptosporydiozy, a przy braku leczenia w skrajnych przypadkach także do śmierci. Do grup podwyższonego ryzyka zarażenia *Cryptosporidium*, oprócz osób zakażonych HIV i/lub chorych na AIDS oraz dzieci poniżej 2 roku życia, obecnie zalicza się głównie pacjentów z immunosupresją indukowaną farmakologicznie. Dlatego też podkreśla się, że zwłaszcza biorcy przeszczepów i pacjenci leczeni onkologicznie stanowią nową grupę ryzyka zarażeń tym patogenem. Co więcej, istnieją dane wskazujące *Cryptosporidium* jako potencjalny czynnik biegunek o nieustalonej etiologii u osób z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit (NChZJ). Ponadto, u pacjentów z niedoborami odporności inwazja *Cryptosporidium* może dotyczyć również lokalizacji pozajelitowych i przyjmować najczęściej postać zarażeń układu oddechowego.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było: **(i)** ocena częstości występowania *Cryptosporidium* w układzie pokarmowym i/lub oddechowym wśród pacjentów immunokompetentnych i poddanych leczeniu immunosupresyjnemu z wybranych grup ryzyka; **(ii)** analiza molekularna oraz filogenetyczna zidentyfikowanych patogenów; **(iii)** porównanie obrazu klinicznego wśród pacjentów zarażonych i niezarażonych.

Badania przeprowadzono z udziałem pięciu grup pacjentów będących pod opieką zarówno Klinik Uniwersytetu Medycznego jak i Dolnośląskiego Centrum Onkologii we Wrocławiu oraz wrocławskich przedszkoli:

- (i)** 90 dzieci z NChZJ zarówno przed jak i w trakcie leczenia immunosupresyjnego, od których pobrano kał;
- (ii)** 105 pacjentów z różnymi chorobami układu oddechowego, w tym poddanych

leczeniu immunosupresyjnymu, od których pobrano materiał w postaci popłuczyn z drzewa oskrzelowego;

- (iii) 158 biorców przeszczepu nerki, poddanych leczeniu immunosupresyjnymu, od których pobrano materiał w postaci płwociny lub kału;
- (iv) 145 immunokompetentnych pacjentów z nowotworem jelita grubego, od których pobrano wycinki tkanek nowotworowych i tkanek z marginesu nowotworu;
- (v) 121 immunokompetentnych dzieci w wieku przedszkolnym od których pobrano kał.

Do oceny częstości występowania *Cryptosporidium* oraz charakterystyki molekularnej zidentyfikowanych patogenów zastosowano nested-PCR oraz sekwencjonowanie. Detekcję *Cryptosporidium* przeprowadzono w oparciu o amplifikację sekwencji nukleotydowej SSU rRNA. Identyfikację gatunków i/lub genotypów *Cryptosporidium* przeprowadzono na podstawie analizy fragmentu sekwencji kodującej SSU rRNA. Szczegółową charakterystykę podtypów w obrębie poszczególnych gatunków/genotypów *Cryptosporidium* określono na podstawie analizy fragmentu sekwencji genu *GP60* *Cryptosporidium*. Wyniki poddano analizie filogenetycznej. Dodatkowo, w celu potwierdzenia obecności oocyst zastosowano metody mikroskopowe. Dane demograficzne i kliniczne pacjentów posłużyły do charakterystyki badanych grup oraz opisu przypadków zarażonych pacjentów. W analizie statystycznej wyników badań zastosowano testy Fishera oraz t-Studenta. Uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu na prowadzenie badań.

Przy użyciu metod molekularnych obecność *Cryptosporidium* wykazano w materiale pobranym od pięciorga spośród 619 (0,8%) przebadanych pacjentów. W obrębie zbadanych grup, *Cryptosporidium* zidentyfikowano u trojga dzieci z NChZJ (3,33%), jednego pacjenta z rakiem jelita grubego, oraz jednego pacjenta z grupy osób z różnymi chorobami płuc. Metodami mikroskopowymi obecność oocyst *Cryptosporidium* potwierdzono u wszystkich zarażonych pacjentów.

Wśród zarażonych dzieci z NChZJ u dwójki z nich analiza molekularna wykazała obecność *C. parvum* podtyp IlaA16G1R1, podczas gdy u jednego dziecka zidentyfikowano *Cryptosporidium* „horse genotype”. Na podstawie analizy molekularnej oraz mikroskopowej *Cryptosporidium* „horse genotype” potwierdzono także w kale u konia, z którym dziecko miało kontakt. Jest to trzeci opisany dotąd przypadek zarażenia tym genotypem *Cryptosporidium* u ludzi i pierwszy z potwierdzoną transmisją zoonotyczną od koni. Wszystkie zarażone dzieci były poddawane leczeniu immunosupresyjnymu (3/47; 6,4%), co sugeruje, że w tej grupie pacjentów leczenie immunosupresyjne może być czynnikiem ryzyka zarażeń *Cryptosporidium*, niezależnie od czasu trwania tego leczenia, aktywności NChZJ, wieku oraz płci.

Przypuszczenie to zostało dodatkowo poparte przez fakt, że nie zidentyfikowano zarażenia *Cryptosporidium* u immunokompetentnych dzieci w wieku przedszkolnym.

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały również obecność *C. meleagridis* z rodziny podtypu IIIg w tkance nowotworowej u immunokompetentnego pacjenta z rakiem jelita grubego. O tym, że jest to aktywne zarażenie tym gatunkiem *Cryptosporidium* świadczy potwierdzenie obecności zarówno oocyst jak i merozoitów w badanej tkance nowotworowej za pomocą znakowania immunofluorecencyjnego. W grupie pacjentów z różnymi chorobami płuc zidentyfikowano pierwszy u człowieka przypadek zarażenia dróg oddechowych spowodowanego przez *C. baileyi*, gatunku opisanego do tej pory tylko u ptaków. Obecność *C. baileyi* zidentyfikowano u immunokompetentnej pacjentki z pojedynczym guzkiem płuc. Przy użyciu znakowania immunofluorecencyjnego w popłuczynach z drzewa oskrzelowego potwierdzono obecność oocyst. W wyniku przeprowadzonych badań nie potwierdzono obecności *Cryptosporidium* w grupie biorców przeszczepu nerki, zarówno w układzie pokarmowym jak i oddechowym. Oprócz przypadku zarażenia *Cryptosporidium* „horse genotype”, w przebiegu którego zaobserwowano biegunkę, pozostałe zarażenia miały przebieg bezobjawowy.

Ponieważ wszystkie zidentyfikowane w ramach niniejszej pracy doktorskiej gatunki *Cryptosporidium* występują powszechnie u zwierząt – ssaków (*C. parvum*, *Cryptosporidium* „horse genotype”), ssaków i ptaków (*C. meleagridis*) jak i tylko u ptaków (*C. baileyi*) – wyniki te wskazują na ryzyko transmisji zoonotycznej i/lub środowiskowej u dzieci z NChZJ i pacjentów ze zmianami nowotworowymi, nawet w przypadku prawidłowo funkcjonującego układu immunologicznego. Biorąc pod uwagę fakt, że obecność *Cryptosporidium* została zidentyfikowana w tkance nowotworowej, w materiale biologicznym pochodzącym od pacjentki z procesem nowotworowym o łagodnej etiologii i pacjentów z chronicznym procesem zapalnym jelit, wyniki te sugerują większą podatność tkanek zmienionych patologicznie na inwazję tym patogenem.

Podsumowując, częstość występowania *Cryptosporidium* na poziomie 0,8% wskazuje na niskie ryzyko zarażenia w zbadanych grupach pacjentów. Niemniej jednak, nie jest to podstawą do całkowitego wykluczenia tego patogenu spośród czynników etiologicznych zarażeń układu pokarmowego i oddechowego. Ponadto, wyniki niniejszej pracy sugerują, że tkanki ulegające zmianie pod wpływem procesu zapalnego i/lub nowotworowego mogą stanowić miejsca sprzyjające inwazji *Cryptosporidium*. Wyniki te stanowią podstawę do prowadzenia dalszych badań z uwzględnieniem pacjentów z nowotworami i pacjentów, u których toczy się przewlekły proces zapalny, nawet w kontekście zarażeń bezobjawowych.

## Abstract

*Cryptosporidium* spp. (*Cryptosporidium*) is an opportunistic parasitic pathogen, which invades gastrointestinal and respiratory epithelial cells of a broad range of vertebrate and invertebrate species. To date, 20 species and genotypes are known to infect humans and among them species from the genus *C. hominis* and *C. parvum* have the greatest clinical significance. Since the same species and/or genotypes are able to infect a wide range of animal species and humans, *Cryptosporidium* oocysts are widely distributed in the environment. Generally, *Cryptosporidium* is known as the etiological agent of chronic diarrhea. In immunocompetent persons invasion is usually limited to the gastrointestinal tract, causing mild diarrhea or may persist as an asymptomatic infection. For that reason, this group of patients is rarely a subject of research. As an opportunistic pathogen, *Cryptosporidium* causes symptomatic infections, most frequently in people with impaired immune system, mainly patients with AIDS. It can lead to chronic cryptosporidiosis as well as to dehydration and even in consequence to death. Currently, patients with pharmacologically induced immunosuppression, especially transplant recipients and oncological patients, represent a new group at the highest risk of such opportunistic infections. Moreover, there is data indicating that *Cryptosporidium* can be a potential factor of diarrhea of unknown etiology among people with inflammatory bowel diseases (IBD). In addition, *Cryptosporidium* can cause disseminated infection, particularly in hosts with immunity deficiencies, most commonly in the form of the respiratory system cryptosporidiosis.

The aim of this dissertation was to: **(i)** determine the presence of *Cryptosporidium* in the gastrointestinal and/or respiratory tract among immunocompetent and immunosuppressive patients in the chosen risk groups; **(ii)** molecular and phylogenetic analysis of identified pathogens; **(iii)** comparison of clinical picture among infected and non-infected patients.

The study included five groups of patients being under the care of clinics of Wrocław Medical University, Lower Silesian Oncology Center and the kindergartens in Wrocław:

- (i)** 90 children with IBD, those receiving and not receiving immunosuppressive treatment, from whom stool samples were collected;
- (ii)** 105 patients with various pulmonary diseases, including those receiving immunosuppressive treatment, from whom bronchial washings (BW) were collected;
- (iii)** 158 renal transplant recipients receiving immunosuppressive treatment, from whom stool or sputum samples were collected;

- (iv) 145 immunocompetent patients, who were being treated for colorectal cancer, from whom colic neoplasia tissue and tissue adjacent colorectal cancer were obtained;
- (v) 121 immunocompetent pre-school children, from whom stool samples were collected.

Molecular methods (nested-PCR) and sequencing were applied to determine the presence of *Cryptosporidium* and for molecular characteristic of identified pathogens. The detection and identification of *Cryptosporidium* were performed using SSU rRNA. Sequence analysis of the *GP60* gene was conducted for subtyping of identified *Cryptosporidium* species. The phylogenetic analysis of the amplified sequences was carried out using available software. Additionally, microscopic methods were used to confirm the infections. Demographic and clinical data enabled characterization of the examined groups and description of infected patients. Statistical analysis of the obtained results involved Fisher's exact and Student's t tests. The project was approved by Bioethical Committee of Wroclaw Medical University.

Using molecular methods, the presence of *Cryptosporidium* was confirmed in five out of 619 (0,8%) tested patients. Within the examined *Cryptosporidium* groups, three children with IBD (3,33%), one patient with colorectal cancer, and one patient from the group of patients with various pulmonary diseases were identified. Microscopic observations revealed the presence of *Cryptosporidium* oocysts in all infected patients.

Among the *Cryptosporidium* positive-children with IBD, molecular analysis showed the presence of *C. parvum* IIaA16G1R1 in two of them. One child was infected with *Cryptosporidium* horse genotype. *Cryptosporidium* horse genotype was confirmed in horse faeces by using molecular and microscopic methods. This is the third previously described case of infection with this genotype in humans and the first confirmed zoonotic transmission from horses. All of the infected children were previously subjected to immunosuppressive therapy (3/47, 6,4%) indicating immunosuppressive treatment as a risk factor for *Cryptosporidium* infections, regardless of duration of treatment, IBD activity, age and sex of children. The lack of *Cryptosporidium* infections among the immunocompetent pre-school children additionally justifies this observation.

The obtained results also identified the presence of *C. meleagridis* from the subtype IIIg in tumor tissue in an immunocompetent patient with colorectal cancer. Due to the genus-specific FITC-labeling, the presence of oocysts and merozoites of *Cryptosporidium* was confirmed, which in turn led to the identification of active infection in the tumor tissue. Among patients with various pulmonary diseases, the first case of avian species of *C. baileyi* infection

was described. The infection with *C. baileyi* was identified in BW of immunocompetent women with solitary pulmonary nodule. The presence of oocysts in BW was confirmed by genus-specific FITC-labeling. Studies carried out among renal transplant recipients did not reveal the presence of *Cryptosporidium* in this group, neither in the gastrointestinal tract nor in the respiratory one. Apart from the *Cryptosporidium* horse genotype child in whom the diarrhea was observed, the remaining infections had an asymptomatic course.

Since all confirmed *Cryptosporidium* species are common in animals – mammals (*C. parvum*, *Cryptosporidium* horse genotype), mammals and birds (*C. meleagridis*), as well as birds only (*C. baileyi*) – these results indicate the risk of zoonotic and/or environmental transmission in IBD children and patients with neoplastic changes, even with properly functioning immune system.

The presence of *Cryptosporidium* has been identified in cancer tissue, the feces of children with chronic intestinal inflammatory process and in BW of patient who also had a pulmonary nodule. Therefore, the results of the present work suggest that pathologically changed tissue may be more susceptible to invasion of *Cryptosporidium*.

In summary, the observed presence of *Cryptosporidium* at 0,8% confirms a low risk of infection in the chosen groups of patients. Nevertheless, *Cryptosporidium* should not be completely excluded as the etiological factor of infections of the digestive and respiratory systems. In addition, the present of the tissue affected by inflammation or cancerous process may be more exposed to infection of *Cryptosporidium*. *Cryptosporidium* invasion among patients with cancerous and inflammation process should be taken into an account during further studies, even in the context of asymptomatic infections.