



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
im. Ludwika Hirszfelda
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE
Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

dr hab. Danuta Witkowska, prof. IITD PAN
Zakład Immunologii Chorób Zakaźnych
Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej

Wrocław, 10.09.2019 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr **Żanety Kopacz**

**pt.: „Ocena częstości występowania oraz charakterystyka molekularna
Cryptosporidium spp. u pacjentów immunokompetentnych oraz z immunosupresją
indukowaną farmakologicznie z wybranych grup ryzyka”**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr **Żanety Kopacz** wykonana została w Katedrze i Zakładzie Biologii i Parazytologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Hendricha i z udziałem promotora pomocniczego dr Marty Kicia.

Kryptosporydioza, to choroba zarówno ludzi, jak i zwierząt, która jest wywoływana przez pierwotniaki z rodzaju *Cryptosporidium*, typ *Apicomplexa*, rząd *Eucoccidiida*, rodzina *Cryptosporidiidae*. Ten oportunistyczny patogen wykazuje naturalną skłonność do komórek nabłonka układu pokarmowego i oddechowego. Inwazje tym pierwotniakiem są na ogół zlokalizowane w komórkach nabłonkowych jelita cienkiego, a w niektórych przypadkach mogą obejmować również nabłonek dróg żółciowych i trzustki. W wyniku zarażenia człowieka i umiejscowienia pierwotniaka w układzie pokarmowym, mogą u pacjenta pojawić się objawy kliniczne jak: podwyższona temperatury ciała, uszkodzenie komórek nabłonka jelit, zaburzenia czynności przewodu pokarmowego, zaburzenia motoryki jelit, biegunki i stany zapalne jelit cienkich. U osób immunokompetentnych inwazja ma najczęściej postać łagodną i po dwóch tygodniach ulega samoograniczeniu. Natomiast u osób z niedoborami odporności jej przebieg ma charakter przewlekły, a bez leczenia może prowadzić do wyniszczenia organizmu, a nawet może być przyczyną śmierci, tym bardziej, że dawka infekcyjna pierwotniaka jest bardzo niska



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

im. Ludwika Hirsfelda

POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

i już 10 - 30 oocyst może wywołać chorobę. Zakażona osoba wydała jednorazowo ponad 100 oocyst, a proces ten może trwać do 50 dni po ustąpieniu objawów biegunki.

Szczególne zainteresowanie zakażeniami tym pierwotniakiem związane było przede wszystkim z epidemią AIDS na świecie, wywołaną przez ludzkiego wirusa niedoboru odporności (HIV). W Polsce od 2001 roku kryptosporydioza znajduje się w wykazie zakażeń i chorób zakaźnych podlegających ustawowemu obowiązkowi zgłaszania. Jednak niewiele laboratoriów diagnostycznych w Polsce prowadzi badania w kierunku kryptosporydiozy, dlatego też wiedza dotycząca rozpowszechnienia *Cryptosporidium* w naszym kraju i jego udziału w wywoływaniu biegunek u ludzi, jest dość ograniczona.

W tym kontekście rozprawa doktorska mgr Żanety Kopacz, dotycząca zbadania u pacjentów z pięciu wybranych grup ryzyka częstości występowania zarażeń pierwotniakiem z rodzaju *Cryptosporidium* i jego charakterystyka molekularna, dobrze wpisuje się w zapotrzebowanie związane z poszerzeniem wiedzy na temat dotyczący innych niż chorzy na AIDS grup pacjentów, którzy mogą być narażeni na takie zagrożenie.

Temat podjęty przez Doktorantkę jest zatem aktualny, uzasadniony, ważny z punktu widzenia biomedycznego i ma nie tylko walory poznawcze, lecz także uzasadnienie kliniczne. W mojej opinii brak w dotychczasowym piśmiennictwie opublikowanych rezultatów badań dotyczących charakterystyki materiału biologicznego pod kątem obecności *Cryptosporidium* w tak dużej liczbie próbek materiału (768) pochodzącego od znacznej liczby (619) pacjentów. Głównym zadaniem Doktorantki było zbadanie częstości występowania pierwotniaków z rodzaju *Cryptosporidium* u pacjentów immunokompetentnych i z immunosupresją indukowaną farmakologicznie z wybranych pięciu grup ryzyka oraz charakterystyka molekularna tych pierwotniaków. Założono, że po zgromadzeniu materiału biologicznego od pacjentów, następstwem oceny ryzyka zarażeń będzie analiza molekularna zidentyfikowanych patogenów, określenie gatunków/genotypów i analiza filogenetyczna oraz porównanie obrazu klinicznego u pacjentów zarażonych i niezarażonych. Cel rozprawy został jasno sformułowany i wynika z przedstawionych we „Wstępie” zagadnień dotyczących biologii pierwotniaka z rodzaju *Cryptosporidium*.

Rozprawa doktorska mgr Żanety Kopacz jest to obszerne opracowanie napisane w języku polskim, zawarte na 165 stronach. Rozprawa ma układ kompletny i odpowiadający



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

im. Ludwika Hirszfelda

POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

wymaganiom dotyczącym rozpraw doktorskich i zawiera: „Wstęp”/53 strony, „Cel pracy”/1 strona, „Materiały i metody/24 strony, „Wyniki”/22 strony, „Dyskusję”/17 stron” oraz syntetycznie sformułowane „Wnioski”/2 strony, oraz „Streszczenie”/5 strony (w jęz. pol. i ang.), Piśmiennictwo/20 stron, oraz 11 tabel i 15 rysunków.

W czytelnie napisanym i interesującym, choć bardzo rozbudowanym, „Wstępie” obejmującym zagadnienia przyporządkowane celowi pracy, Doktorantka wprowadza w tematykę rozprawy. Zapoznaje czytelnika z taksonomią pierwotniaka z rodzaju *Cryptosporidium* i jego cyklem życiowym oraz epidemiologią zarażeń i drogami transmisji, a także z patogenezą oraz obrazem klinicznym zarażeń i odpowiedzią immunologiczną organizmu gospodarza. Przedstawia również stosowane metody diagnostyczne i opisuje grupy ryzyka zakażeń. Całość tego rozdziału świadczy o dobrej znajomości aktualnego piśmiennictwa, odpowiedniej wiedzy i dobrym przygotowaniu do podjętych badań.

Nie mniej jednak z obowiązku recenzenta chciałabym zauważyć, że rozdział ten liczący 53 strony, jest w mojej opinii nieco zbyt rozbudowany. Pragnę jednak podkreślić, że po skróceniu i bardziej syntetycznym ujęciu niektórych zagadnień dotyczących *Cryptosporidium*, rozdział ten stanowi świetny materiał na dobrą pracę przeglądową dotyczącą tych drobnoustrojów. Doktorantka nie ustrzegła się w nim drobnych błędów edytorskich jak: brak lub przestawianie liter, błędy w nazwie stosowanego leku czy zbyt długie zdania o dość zawiłym wątku (przykłady m. in. na str 16, 23, 25, 26, 27, 30, 36, 42, 68).

Piśmiennictwo rozprawy to 312 pozycje, które świadczą o zapoznaniu się Doktorantki z ogromem literatury naukowej, nie mniej jednak sporo pozycji piśmiennictwa to pozycje dosyć „wiekowe” i uważam, że zamiast nich możnaby cytować jednak głównie najnowsze publikacje oraz uwzględnić w cytowaniach prace przeglądowe, które w swojej treści zawierają już omówione starsze pozycje.

Rozdział „Materiał i metody” jasno i szczegółowo opisuje zarówno grupy pacjentów jak pozyskany do badań materiał biologiczny. Odnośnie części rozdziału zawierającej opis stosowanych metod badań uważam, że rozdział ten jest poprawny, a dobór metod odpowiednio dobrany do realizacji założonych celów. Przedstawione zostały szczegółowe informacje dotyczące wykonanych procedur umożliwiające ewentualne powtórzenie przedstawionych w pracy badań. Lista opisanych procedur i badań jest wyczerpująca i nie pozostawia wątpliwości,



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

im. Ludwika Hirsztfeldta

POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

że Doktorantka znakomicie opanowała warsztat badawczy w zakresie niezbędnym do oceny wyników badań stanowiących cel niniejszej rozprawy doktorskiej.

Jednak w tym rozdziale w Tabeli 5 (str. 81) nie znalazłam informacji stanowiącej odpowiedzi na pytanie czy startery użyte w reakcji amplifikacji DNA *Cryptosporidium* zostały np. samodzielnie zaprojektowane przez Doktorantkę, co zawsze podnosi wartość pracy. Natomiast jeśli Doktorantka korzystała z sekwencji zaprojektowanych przez innych autorów, to z pewnością powinien być podany odpowiedni odnośnik literaturowy. Druga drobna uwaga dotycząca tego rozdziału związana jest z opisaną procedurą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). Zabrakło w niej informacji dotyczącej ilości wyizolowanego DNA użytego do amplifikacji jako matrycy. Podana została jedynie objętość wprowadzanej matrycy (str. 90 cyt. „w przypadku amplifikacji genów *Cryptosporidium* do mieszaniny dodawano 3 μ l matrycy zarówno w pierwszym jak i w drugim etapie nested-PCR”), lub jak na str. 90 cyt „w przypadku amplifikacji beta-globiny dodawano 1 μ l”, bez podania ile to było nanogramów DNA. Oczywiście, że w wyniku izolacji DNA prowadzonej wg standardowej procedury i zgodnie z zaleceniami producenta, można przypuszczać, że powinno się uzyskać podobną wydajność DNA. W klasycznej metodzie PCR konieczna jest matryca DNA w ilości 50 pikogramów, a w przypadku nested-PCR już 50 femtogramów matrycowego DNA to ilość, która pozwala uzyskać produkty reakcji. Zwykle do reakcji PCR można użyć od 10 - 100 ng matrycy DNA, dobrze byłoby zatem zamieścić stosowną informację w rozdziale lub umieścić dane o stężeniu wyizolowanego DNA i wtedy można wpisywać tylko objętość próbki wprowadzanej matrycy.

Wyniki zostały szczegółowo opisane w kolejnym rozdziale. W każdej próbce materiału biologicznego uzyskanego od pacjentów przeprowadzono detekcję *Cryptosporidium* stosując metodę zagnieżdżonego – PCR (nested-PCR) z zastosowaniem specyficznych starterów w oparciu o amplifikację sekwencji nukleotydowej SSU rRNA. Na podstawie analizy sekwencji zamplifikowanych genów kodujących SSU rRNA lub *HSP70* i aktywny oznaczono gatunki/lub genotypy pierwotniaka. Stosując metody mikroskopowe potwierdzano obecność oocyst lub form troficznych pierwotniaka w badanym materiale.

Wyniki uzyskane przez Doktorantkę to efekt badań przeprowadzonych na dużej grupie pacjentów, są dobrze udokumentowane w tabelach, na rycinach i zostały poddane analizie statystycznej. Tym bardziej, że wskutek zarówno braku możliwości profilaktycznych jak i braku



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

im. Ludwika Hirsztfeldta

POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

skutecznej terapii, pierwotniak ten jest ważnym problemem zdrowia publicznego, a z uwagi na różnorodność gatunków zarówno diagnostyka *Cryptosporidium* jak i postępowanie w przypadku zarażeń, stanowią niewątpliwie trudny temat. Ponadto uzyskane wyniki zwracają uwagę na realną możliwość wystąpienia zarażeń nie tylko wśród chorych na AIDS, lecz także wśród pacjentów z immunosupresją indukowaną farmakologicznie, jak pacjenci onkologiczni, biorcy przeszczepów, czy chorzy z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit. Są interesujące tym bardziej, że *Cryptosporidium* nie jest uwzględniane w rutynowej diagnostyce pacjentów z zaburzoną odpornością i biegunkami o nieznannej etiologii, stąd też dane dotyczące częstości zarażeń są często niedoszacowane. Jak wynika z uzyskanych rezultatów dotyczących pacjentów poddanych immunosupresji, już stosowanie jednolekowej terapii immunosupresyjnej może być wystarczającym czynnikiem zwiększającym ryzyko zarażenia tym pierwotniakiem. Wyniki Doktorantki mogą także sugerować, że w przypadku tkanek ulegających zmianie pod wpływem procesu zapalnego lub nowotworowego stanowić mogą one miejsca sprzyjające inwazji pierwotniaka.

Doktorantka, w obszernej „Dyskusji”, w sposób wyczerpujący omówiła uzyskane wyniki na tle dostępnego piśmiennictwa. Otrzymane rezultaty poddała rzeczowej dyskusji w odniesieniu do wyników uzyskanych przez innych autorów. Podkreśliła, że elementem nowości jest stwierdzenie występowania zarażenia pierwotniakiem *Cryptococcus meleagridis* poza jelitem cienkim, a mianowicie u pacjenta z nowotworem jelita grubego, a identyfikacja oocyst i merozoitów wskazuje na aktywne zarażenie w tkance nowotworowej. Ponadto, stwierdzenie obecności *Cryptosporidium baileyi* w układzie oddechowym immunokompetentnej pacjentki ze zdiagnozowaną zmianą nowotworową płuc o łagodnej etiologii, to również pierwszy potwierdzony metodami biologii molekularnej przypadek zarażenia dróg oddechowych człowieka innym gatunkiem niż *C. hominis* czy *C. parvum*. Sprawnie poprowadzona dyskusja świadczy o dobrej znajomości zagadnień dotyczących biologii i identyfikacji rodzaju *Cryptosporidium* w badanym materiale biologicznym. Sformułowane przez Doktorantkę „Wnioski” wynikają z przeprowadzonych badań i odpowiadają postawionym celom.

Uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr Żanety Kopacz jest wartościowa, została prawidłowo zaplanowana i zrealizowana, a także wnosi oryginalny, istotny wkład do wiedzy dotyczącej biologii *Cryptosporidium* oraz dostarcza cennych wiadomości o charakterze poznawczym. Doktorantka wykazała się także znajomością piśmiennictwa, które jest właściwie wykorzystane, co



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

im. Ludwika Hirsztfelda

POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

dowodzi swobodnego poruszania się w omawianym zagadnieniu i dobrym opanowaniu warsztatu badawczego.

Wniosek końcowy

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej stwierdzam, że jest to praca oryginalna z istotnymi elementami nowości naukowej, a uzyskane wyniki stanowią cenny materiał do dalszych badań laboratoryjnych i klinicznych. Sformułowane na podstawie uzyskanych rezultatów wnioski mogą przyczynić się do zwrócenia baczniejszej uwagi na występowanie zarażeń pierwotniakiem z rodzaju *Cryptosporidium* u innych pacjentów niż chorzy na AIDS, a celem nadrzędnym jest profilaktyka i skuteczne leczenie. Doktorantka wykazała się znajomością omawianych zagadnień, odpowiednim opanowaniem warsztatu badawczego i samodzielnością myślenia.

Uważam, że rozprawa doktorska Pani Żanety Kopacz spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) i wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o przyjęcie tej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej

dr hab. Danuta Witkowska, prof. PAN