



UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU  
WYDZIAŁ NAUK O ZDROWIU

KATEDRA I ZAKŁAD PROFILAKTYKI ZDROWOTNEJ

KIEROWNIK: PROF. ZW. DR HAB. MED. JACEK WYSOCKI

Collegium Anatomicum  
ul. H. Święcickiego 6  
60-781 Poznań

tel. 61 854 65 77  
tel. 61 854 65 76  
jwysocki@ump.edu.pl

dr hab. Ewelina Gowin  
Katedra i Zakład Profilaktyki Zdrowotnej  
Uniwersytet Medyczny  
im.K.Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 17.11.2023

## Recenzja

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorstwa autorstwa mgr Mariusza Piotrowskiego zatytułowana „Urbanizacja a patogeny przenoszone przez kleszcze: studium porównawcze występowania bakterii z rodzaju *Rickettsia* w kleszczach w środowisku miejskim i naturalnym” porusza bardzo istotny problem jakim są choroby przenoszone przez kleszcze.

W Europie *Ixodes ricinus* (*I. ricinus*) i *Dermacentor reticulatus* (*D. reticulatus*) są najliczniejszymi i szeroko rozpowszechnionymi gatunkami kleszczy, które przenoszą liczne patogeny odpowiedzialne za wywoływanie chorób u ludzi. Jak wykazują badania, nawet u 40% kleszczy *D. reticulatus* i 4% *I. ricinus* z terenów polskich wykazuje się obecność materiału genetycznego riketsji.

Riketsjozy charakteryzują się niespecyficznym obrazem klinicznym: gorączką, bólem głowy, mięśni i stawów, drobną plamisto-grudkową lub grudkową wysypką. Może także pojawić się charakterystyczny czarny strup w miejscu pokłucia przez kleszcze. Przebieg gorączek plamistych jest zazwyczaj łagodny. Średni czas wylęgania wynosi od 3 do 12 dni. Czynniki ryzyka ciężkiego przebiegu to: zaawansowany wiek, zaburzenia odporności, alkoholizm, deficyt dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej. Diagnostyka riketsjoz jest trudna. Hodowla jest jedynie możliwa w wyspecjalizowanych laboratoriach o poziomie bezpieczeństwa BSL3. Największa czułość badania jest w ostrym okresie choroby, przed rozpoczęciem leczenia przeciwbakteryjnego. Podstawą diagnostyki są

badania serologiczne – wykrywanie swoistych przeciwciał w klasie IgG i IgM metodą immunofluorescencji pośredniej. Czterokrotny wzrost miana przeciwciał w odstępie kilku tygodni lub serokonwersja potwierdzają rozpoznanie. Przeciwciała przeciwko riketsjom utrzymują się w surowicy wiele lat po ustąpieniu zakażenia, dlatego ich oznaczanie nie jest wykorzystywane do monitorowania skuteczności leczenia. W pierwszych tygodniach choroby największą czułość wykazują badania molekularne. Wykrycie DNA riketsji w materiale pobranym od pacjenta pozwala na pewne postawienie rozpoznania. Lekiem preferowanym w leczeniu riketsjoz jest doksycyklina. Z uwagi na jej wyjątkową skuteczność, jest warunkowo dopuszczona do leczenia riketsjoz także u dzieci. Doksycyklina jest w Polsce powszechnie stosowana w leczeniu boreliozy. Zatem w przypadku koinfekcji riketsjami pacjent będzie skutecznie leczony. Z uwagi na nieliczne przypadki riketsjoz w Polsce świadomość wśród lekarzy jest niska. Publikowanie prac dotyczących rozpowszechnienia riketsji w populacji kleszczy może zwrócić uwagę na ten problem.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska obejmuje 190 stron maszynopisu. Układ pracy jest typowy rozpoczyna się wykazem skrótów, następnie wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenia w języku polskim, angielskim, wykaz prac naukowych powstałych podczas realizacji pracy doktorskiej oraz spis literatury.

W obszernym wstępie doktorant rozpoczyna od omówienia riketsjoz. Następnie przedstawiona jest charakterystyka kleszczy: taksonomia, morfologia, cykl rozwojowy, cykl żerowania, występowanie. Na uwagę zasługują autorskie zdjęcia przedstawiające poszczególne stadia rozwojowe kleszczy. Kolejną część wstępu stanowi charakterystyka riketsji: biologia, budowa genomu, patogenez, epidemiologia i rozmieszczenie bakterii.

Jako główny cel pracy autor podaje: „porównanie różnic w występowaniu bakterii z rodzaju *Rickettsia* w środowisku miejskim na przykładzie Poznania oraz środowisku naturalnym, reprezentowanym przez obszar Wielkopolskiego Parku Narodowego”. Znacznie lepiej brzmi cel podany w streszczeniu: „porównanie występowania bakterii z rodzaju *Rickettsia* w populacjach kleszczy środowiska miejskiego i naturalnego”. W drugiej wersji autor nie zakłada z góry istnienia różnic.

Analiza obejmowała ocenę wpływu szeregu czynników na występowanie bakterii:

- stadium rozwojowe kleszcza
- sezonowa aktywność kleszczy
- warunki środowiskowe
- miejsce występowania kleszczy.

Zakładaną hipotezą badawczą była teza o braku wpływu czynników zewnętrznych na występowanie bakterii *Rickettsia* w populacji kleszczy.

Celem pośrednim badania była analiza ryzyka zdrowotnego związanego z obecnością bakterii *Rickettsia* w populacjach kleszczy. Powstaje pytanie jak doktorant oceniał ryzyko zdrowotne związane z obecnością bakterii w kleszczach.

Fakt wykrycia materiału genetycznego drobnoustroju w kleszczu, który ukłuł pacjenta, nie świadczy o zakażeniu człowieka. Od lat środowisko lekarskie walczy z wykonywanymi komercyjnie badaniami molekularnymi kleszczy, gdyż nie są sposobem oceny ryzyka rozwoju choroby po pokłuciu przez kleszcze. O wystąpieniu zakażenia decyduje szereg czynników w tym dawka patogenu, czas, po którym usunięto kleszcza, odpowiedź odpornościowa organizmu.

Cele dobrano w trafny sposób – mogłyby być jednak wyrażone bardziej zrozumiale. W rozdziale cele autor pisze również o praktycznym aspekcie wykonywanych badań.

W sekcji materiał i metody opisano szczegółowo sposób przeprowadzenia badania. Zbiór kleszczy prowadzony był w 10 lokalizacjach w okresie od kwietnia 2018 roku do października 2019 roku. Doktorant precyzyjnie określił sposób oraz punkty zbierania kleszczy. Załączona jest dokumentacja fotograficzna. W celu wykrycia obecności DNA *Rickettsia* spp. Wszystkie kleszcze poddano analizie molekularnej z wykorzystaniem markerów *gltA*, *ompA* i ITS. W celu potwierdzenia identyfikacji gatunkowej dla wybranych próbek przeprowadzono także sekwencjonowanie. W punkcie opisującym badania molekularne brakuje informacji o sposobie selekcjonowania próbek do identyfikacji gatunkowej (sekwencjonowania). Do sekwencjonowania wysłano 32 próby – wszystkie dodatnie próbki od *D. reticulatus* oraz część dodatnich od *I. ricinus*. Proszę o wyjaśnienie.

Rozdział wyniki zawiera bardzo dobrze zaprezentowane wyniki oraz skrupulatnie i wielokierunkowo poprowadzoną analizę. Konstrukcja tabel i wykresów jest przejrzysta. Doktorant w celu identyfikacji gatunkowej riketsji wykorzystał trzy markery. W celu identyfikacji *R. monacensis* wykorzystano sekwencję ITS, w celu identyfikacji riketsji innych niż *R. helvetica* zastosowano marker *ompA*. Wszystkie 32 zsekwencjonowane próby potwierdziły pierwotne założenia. DNA *R. helvetica* wykryto w próbach dodatnich dla *gltA* i ITS, ale ujemnych dla *ompA*. DNA *R. monacensis* wykryto w próbach dodatnich dla *gltA* i *ompA* oraz z prążkiem ITS o 150 nukleotydów krótszym niż dla *R. helvetica*. DNA *R. raoultii* wykryto w próbach dodatnich dla *gltA* i *ompA*, ale ujemnych dla ITS. Na stronie 104 wymaga wyjaśnienia określenie „wybrane próby”: „Do identyfikacji gatunkowej bakterii z

rodzaju *Rickettsia* wybrane 32 próby poddano reakcji sekwencjonowania". W jaki sposób dokonano wyboru prób do sekwencjonowania – informacja powinna być zawarta w sekcji metody.

Praca dostarcza cennych obserwacji na temat aktywności kleszczy, wskazuje momenty szczytu aktywności na przestrzeni dwóch lat. Odsetek zakażonych kleszczy wynosił około 13% - wyższy był na obszarze Wielkopolskiego Parku Narodowego (15,5%) w porównaniu do terenów miejskich (9,4%). W każdym roku w trakcie jednego miesiąca odsetek zakażonych kleszczy był wyraźnie niższy- to bardzo ciekawa obserwacja. W dyskusji autor próbuje znaleźć odpowiedź czym można wytłumaczyć to zjawisko.

Tabela 53 na str. 112 w przejrzysty sposób przedstawia gatunki riketsji wykrywane w poszczególnych stanowiskach. Jasno wynika z niej, że *R. helvetica* wykrywana była u kleszczy ze wszystkich stanowisk, a *R. raoultii* tylko u kleszczy w dwóch z pięciu stanowisk naturalnych.

Dyskusja została podzielona na trzy części odzwierciedlające cele pracy: występowanie kleszczy, obecność riketsji w populacji kleszczy i zagrożenia zdrowotne związane z występowaniem kleszczy. Autor w interesujący sposób zestawia uzyskane wyniki z danymi literaturowymi.

W części wnioski autor podaje 11 wniosków. Wniosek pierwszy wymaga wyjaśnienia: w metodach pracy nie różnicowano obszarów miejskich w zależności od stopnia wpływów antropogenicznych.

Wniosek 7: Po raz pierwszy wykryto *D. reticulatus* na terenie Poznania i Wielkopolskiego Parku Narodowego oraz wykryto *R. raoultii* na obszarze Wielkopolskiego Parku Narodowego. To bardzo istotne znalezisko – autor informuje o nim kilkakrotnie pracy kilkakrotnie poczynawszy od wstępu.

We wniosku 9 autor podaje, że wszystkie izolaty poddane reakcji sekwencjonowania potwierdziły pierwotne założenia o możliwości identyfikacji gatunkowej bakterii rodzaju *Rickettsia*. Te interesujące badania nie zostały jednak uwzględnione w celach pracy.

Nie zgadzam się z wnioskiem 10 – jak już wspomniałam wcześniej wykrycie obecności materiału genetycznego drobnoustroju w kleszczu który ukłuł pacjenta nie jest jednoznaczne z zakażeniem.

Wniosek 11 nie znajduje potwierdzenia w wynikach – ma charakter spekulacyjny - mógłby stanowić doskonałe zakończenie dyskusji, która urywa się bez podsumowania.

Literatura obejmuje 307 pozycji piśmiennictwa w tym szereg najnowszych pozycji także z roku 2023.

Mimo bardzo starannie przygotowanej szaty graficznej doktorant nie uniknął błędów stylistycznych i edytorskich. Szczególnie dotyczących użycia słowa prewalencja,

„prewalencji kleszczy *I. ricinus* i *D. reticulatus* bakteriami *Rickettsia* spp.” str 160

„prewalencji kleszczy *Rickettsia* spp.” Str 159

„prewalencja *Rickettsia* spp. w kleszczach” str 155

„Rzadko diagnozowane mimo prewalencji” wyżej od str 155

„biorąc pod uwagę prewalencję kleszczy krętkami” Str 154

Można się domyśleć, że ma ono oznaczać częstość zakażenia, ale takie zastosowanie nie ułatwia czytania pracy.

Inne uwagi stylistyczne to używanie niewłaściwych określeń jak:

„kompleks chorobowy” str. 7, zamiast grupa chorób

„patogeny chorobotwórcze” str. 19 –zamiast patogeny lub drobnoustroje chorobotwórcze.

„wrodzona sygnalizacja immunologiczna” str. 32 – zamiast odporność wrodzona

„indukowane komórki regulatorowe T” str. 32 zamiast indukowane limfocyty T regulatorowe.

Pojęcie gangrena jest błędnie użyte dwukrotnie w tabeli na str. 36 – Gangrena lub inaczej zgorzel to zakażenie skóry i tkanki podskórnej prowadzące do martwicy wywołane przez bakterie z rodzaju *Clostridium*.

Używane kilkakrotnie (Str. 146, 160, 161) określenie *Borrelia* spp. zamiast *Borrelia* spp. nie znajduje uzasadnienia w literaturze.

W pracy nie brakuje też powtórzeń, np. podział rodzaju *Rickettsia* na grupy jest umieszczony na str. 7 i 22.

O tych drobnych potknięciach piszę z obowiązku recenzenta, rozumiem jednak, że nie sposób ich uniknąć przy tak obszernej pracy. Nie umniejszają one w żaden sposób wartości merytorycznej pracy.

Podsumowanie

Praca zawiera interesujące wyniki będące rezultatem czasochłonných, skrupulatnie przeprowadzonych badań. Autor wykazał się umiejętnością konstruowania badań naukowych, doboru metod piśmiennictwa i sprawną dyskusją wyników. Podczas realizacji



prac naukowych związanych z rozprawą doktorską, na przestrzeni ostatnich lat doktorant opublikował cztery prace. Świadczy to o dużym zaangażowaniu doktoranta w podejmowaną tematykę.

Uzyskane przez doktoranta wyniki stawiają w nieco innym świetle dotychczas mało popularny problem riketsjoz przenoszonych przez kleszcze.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska autorstwa mgr Mariusza Piotrowskiego spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne *określone w art. 187 ust. 1-2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 r. poz. 742 ze zm.)*. W związku z powyższym występuję do rady Naukowej Instytutu Biologii Uniwersytetu Szczecińskiego o przeprowadzenie dalszych etapów postępowania w sprawie nadania mgr Mariuszowi Piotrowskiemu stopnia naukowego doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.



p.o. Z-ca Kierownika Oddziału  
Obserwacyjno-Zakaźnego  
dr hab. n.med. Ewelina Gowin  
specjalista w zakresie chorób zakaźnych,  
pediatrii i ginekologii rodzinnej