



Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Prof. dr hab. n. med. Danuta Kosik-Bogacka

Szczecin, 17.11.2023 r.

Samodzielna Pracownia Botaniki Farmaceutycznej

Katedra Biologii i Parazytologii Medycznej

Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

### RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Mariusza Piotrowskiego pt. „Urbanizacja a patogeny przenoszone przez kleszcze: studium porównawcze występowania bakterii z rodzaju *Rickettsia* w kleszczach w środowisku miejskim i naturalnym” wykonanej w Instytucie Biologii Uniwersytetu Szczecińskiego pod kierunkiem Pani dr hab. Anna Rymaszewska, prof. US.

Temat rozprawy doktorskiej Pana mgr Mariusza Piotrowskiego został sformułowany prawidłowo i w pełni oddaje cele oraz założenia przedstawionych w pracy doktorskiej badań. Rozprawa ma formę monografii zawartej na 190 stronach. Zawiera 57 tabel oraz 32 ryciny, które są integralną częścią pracy doktorskiej i szczegółowo ilustrują przedstawione w pracy dane. Rozprawa obejmuje: spis treści, wykaz skrótów, wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz spis piśmiennictwa naukowego, natomiast brakuje spisu tabel i rycin.

Rozprawa doktorska napisana jest bardzo starannie, z dbałością o język polski. Doktorant jednak nie uniknął drobnych pomyłek literowych. Ponadto użyte zostały niezbyt fortunate określenia, np. „kleszcze wyprostowują pierwszą parę nóg” (str. 17), „kleszcze wbijają swoje szczęki w skórę żywiciela” (str. 18), „po ucieczce mogą ponownie rozpocząć cykl życia” (str. 25), „zostały uwięzione w otocze jądrowej” (str. 27), „życie wewnątrzkomórkowe ukształtowało genomy riketsji” (str. 28). W niektórych częściach pracy nazwy gatunkowe w języku łacińskim nie są

napisane kursywą. Pomimo, że często używane jest słowo osobniki do określenia liczby zwierząt, to zdarza się w pracy użycie słowa sztuki.

Kleszcze są ektopasożytami człowieka i wielu gatunków kręgowców. W Polsce gatunkiem pospolitym i najczęściej atakującym ludzi jest kleszcz pospolity (*Ixodes ricinus*). W przeciwieństwie do tego gatunku, zasięg występowania kleszcza łąkowego (*Dermacentor reticulatus*) jest ograniczony do północno-wschodnich i wschodnich części kraju, jednak obserwuje się ciągłą jego ekspansję. Kleszcze są wektorami wielu gatunków wirusów, bakterii oraz pierwotniaków. Od wielu lat obserwuje się wzrost liczby przypadków chorób transmisyjnych przenoszonych przez te hematofagiczne stawonogi, co może być związane między innymi ze zwiększeniem zasięgu geograficznego kleszczy oraz patogenów przez nie przenoszonych. Chorobami odkleszczowymi najczęściej stwierdzanymi u ludzi są borelioza z Lyme, kleszczowe zapalenie mózgu, anaplazmoza i babeszjoza. Przypadków zakażenia *Rickettsia* spp. jest mniej, dlatego w piśmiennictwie naukowym jest niewiele prac badawczych dotyczących występowania i różnorodności tych bakterii u kleszczy w Polsce. Infekcje wywołane przez *Rickettsia* spp. stanowią grupę gorączek plamistych charakteryzujących się niespecyficznym obrazem klinicznym. W związku z tym uważam, że podjęty przez Doktoranta temat badań dotyczący częstości występowania *Rickettsia* spp. u kleszczy zebranych na terenach wykorzystywanych przez mieszkańców Poznania i okolic do celów rekreacyjnych w obrębie miasta i poza nim jest niezwykle interesujący. Podjęte przez Doktoranta badania są bardzo ważne z punktu widzenia poznawczego, jak i praktycznego. Wyniki badań umożliwią ocenę aktualnych zagrożeń epidemiologicznych oraz prognozowanie ryzyka zakażenia *Rickettsia* spp. ludzi na terenie Wielkopolski.

We wstępie pracy Doktorant przejrzysto przedstawił podstawy naukowe rozprawy, a także uzasadnił potrzebę prowadzenia badań. Wykorzystując dane z piśmiennictwa naukowego dokonał opisu aktualnego stanu wiedzy dotyczącego między innymi biologii kleszczy oraz ich roli jako wektora patogenów, w tym bakterii z rodzaju *Rickettsia*. Ta część pracy jest bardzo dobrze skonstruowana, jest napisana zwięźle i przejrzysto, co świadczy o dokładnej analizie dostępnych danych.

Przedstawione cele zawierają klarowne uzasadnienie podjętych badań. Zostały sprecyzowane jasno i odpowiadają kolejnym etapom prowadzonych badań. Głównymi celami badań było określenie liczebności i przynależności gatunkowej kleszczy zebranych na terenach rekreacyjnych znajdujących się na terenie miasta Poznania oraz w Wielkopolskim Parku Narodowym (WPN). W analizie uwzględniono stadia rozwojowe kleszczy, ich sezonową aktywność oraz warunki środowiskowe bytowania kleszczy. Ponadto analizowano częstość występowania bakterii z rodzaju *Rickettsia* u zebranych kleszczy.

Rozdział Materiały i metody został przygotowany starannie i umożliwia innym badaczom powtórzenie badań. Kleszcze zbierano raz w miesiącu od kwietnia 2018 roku do października 2019 roku metodą flagowania. Wytypowano dziesięć obszarów zbioru kleszczy, w tym pięć miejsc rekreacyjnych na terenie miasta Poznania oraz tyle samo na terenie WPN, były to miejsca o bardzo małym stopniu antropopresji wykorzystywane turystycznie. Przynależność gatunkową i stadium rozwojowe określono z wykorzystaniem klucza do oznaczania kleszczy. Do oceny ekstensywności zakażenia zebranych kleszczy bakteriami *Rickettsia* spp. zastosowano metody molekularne z wykorzystaniem markerów *gltA*, *ompA* i *ITS*, a do potwierdzenia identyfikacji gatunkowej bakterii dla wybranych prób wykorzystano metodę sekwencjonowania. Wykorzystane w pracy testy statystyczne są dobrane prawidłowo.

W rozdziale Wyniki Doktorant bardzo wnikliwie i szczegółowo opisał uzyskane wyniki badań z wykorzystaniem licznych rycin i tabel, co ułatwia analizę przedstawionych danych. Do badań wykorzystano 1702 kleszcze głównie *I. ricinus* (ponad 99%). W puli zebranych kleszczy po raz pierwszy na terenie Wielkopolski stwierdzono *D. reticulatus* (n=10). Na terenie miasta Poznania zauważono wzrost zebranej liczby kleszczy w 2019 r. w porównaniu do 2018 r. Najwięcej kleszczy zebrano na terenie WPN, jednak stanowiskiem na którym odłowiono najwięcej kleszczy były tereny rekreacyjne w obrębie Parku Maltańskiego. Na terenach leśnych najczęściej stwierdzano nimfy, natomiast na terenach zmienionych antropogenicznie postaci dojrzałe. Zmiany klimatyczne, zaobserwowane również w badaniach własnych, spowodowały że na badanym terenie u kleszczy występował jeden wiosenno-letni szczyt aktywności. Na podstawie wyników badań molekularnych Doktorant stwierdził DNA bakterii z rodzaju *Rickettsia* u 12,9% badanych kleszczy,

w tym u 12,8% *I. ricinus* i 40% *D. reticulatus*. Najwięcej zakażonych kleszczy stwierdzono na terenie WPN, a najczęściej zakażone były postaci dojrzałe. Podobną częstość zakażenia kleszczy tym patogenem stwierdzono na terenie miasta Poznania. Zidentyfikowano trzy patogenne dla ludzi gatunki: *R. helvetica*, *R. monacensis* i *R. raoultii*. *Rickettsia helvetica* i *R. monacensis* stwierdzono u *I. ricinus*. Natomiast *R. raoultii*, po raz pierwszy stwierdzony na tym terenie, występował wyłącznie u *D. reticulatus*.

W dalszej części rozprawy Doktorant wyczerpująco i krytycznie zestawiał wyniki badań własnych i porównał je z wynikami badań innych autorów. Pozwala to pozytywnie ocenić Jego specjalistyczną wiedzę, umiejętność rozwiązywania problemów badawczych, korzystanie z piśmiennictwa naukowego oraz interpretację wyników badań.

Wnioski, w liczbie 11, kończą zasadniczą część rozprawy doktorskiej mgr Marcina Piotrowskiego. Zostały zredagowane jasno w oparciu o uzyskane wyniki, zgodnie z założeniami pracy. Wskazują na dojrzałość naukową Doktoranta i posiadaną umiejętność syntetycznego przedstawienia efektów przeprowadzonych badań. Jednak wnioski powinny być ponumerowane, a pierwsze osiem wniosków według mnie to podsumowanie wyników. Dlatego rozdział ten powinien być nazwany Podsumowanie i wnioski. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorant stwierdził, że reakcja PCR z wykorzystaniem fragmentu genu *gltA*, *ompA* i ITS może być powszechnie stosowana do identyfikacji riketsji, w tym *R. helvetica*, *R. monacensis* i *R. raoultii*. Zauważył, że ze względu na dużą częstość zakażenia kleszczy *Rickettsia* spp. prawdopodobnie liczba rejestrowanych przypadków riketsjoz w Polsce jest niedoszacowana. Podkreślił także potrzebę monitorowaniu chorób przenoszonych przez kleszcze oraz edukacji dotyczącej profilaktyki chorób odkleszczowych.

Spis piśmiennictwa naukowego zawiera 307 pozycji z piśmiennictwa naukowego. Na podkreślenie zasługuje zarówno bardzo dobry ich dobór, jak i aktualność. Poszczególne pozycje piśmiennictwa są poprawnie cytowane w rozprawie. Jednak dwie publikacje Hauck i wsp. z 2020 roku oraz Hornok i wsp. z 2014 roku powinny być rozróżnione literami a i b. W wykazie piśmiennictwa pominięto cytowane w tekście pracy dwie publikacje (Liberska i wsp. 2022, Trzebny i wsp. 2023), a także nie zacytowano kilku prac (Frances i Wirtz 2005, Šimo i wsp.

2004, Tomassone i wsp. 2018). Ponadto w niektórych pozycjach piśmiennictwa występuje dokładana data publikacji (dzień i miesiąc).

Streszczenia, zarówno napisane w języku polskim, jak i angielskim, są zredagowane prawidłowo i zawierają wszystkie najważniejsze elementy rozprawy.

Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na nieliczne uchybienia jakie zaobserwowałam w pracy:

1. w opisach tabel należy wyjaśnić zastosowane skróty i symbole, w tym symbole oznaczające miejsca zbioru kleszczy, ułatwi to czytelnikowi analizę wyników, nie będzie potrzeby wyszukiwania tych objaśnień w opisie zamieszczonym w rozdziale Materiały i metody;
2. w tabelach 30 i 31, 32 i 33 oraz 34 i 35 przedstawione są te same dane, tylko zestawione w inny sposób, w związku z tym należałoby usunąć tabele 31, 33 i 35.

Wszystkie uwagi zamieszczone w recenzji nie wpływają na wartość pracy, którą uważam za bardzo dobrą i wartościową.

Podsumowując, poziom merytoryczny przedstawionej rozprawy doktorskiej oceniam bardzo wysoko. Doktorant wykazał się wyjątkowym przygotowaniem metodycznym i teoretycznym w zakresie badanych zagadnień oraz wysokim stopniem samodzielności naukowej. Badania były bardzo dobrze zaplanowane i przeprowadzone. Mają one charakter poznawczy i praktyczny. Praca jest nowatorska, a przedstawione wyniki badań wskazują na całkowitą realizację celów założonych w pracy. Stanowi cenny wkład w polskie i światowe badania parazytologiczne w kontekście badań nad kleszczami oraz oszacowaniem zagrożeń zakażenia *Rickettsia* spp. Na podkreślenie zasługuje w szczególności wykazanie nowych stanowisk kleszcza *Dermacentor reticulatus* i *Rickettsia raoultii* na terenie Wielkopolski.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana magistra mgr Mariusza Piotrowskiego spełnia warunki 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.). Dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Biologii o dopuszczenie Pana magistra Mariusza Piotrowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z uwagi na kompleksowość badań i dużą wartość merytoryczną wnoszę do Wysokiej Rady o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Mariusza Piotrowskiego.