

UNIWERSYTET  
WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ BIOLOGII I BIOTECHNOLOGII

KATEDRA BIOCHEMII

Dr hab. Małgorzata Dmitryjuk, prof. UWM  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Katedra Biochemii  
ul. Oczapowskiego 1A  
10-719 Olsztyn  
[m.dmit@uwm.edu.pl](mailto:m.dmit@uwm.edu.pl)  
tel. 602 439 368

## RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Mgra. Mariusza Piotrowskiego

pt.

**Urbanizacja a patogeny przenoszone przez kleszcze: studium porównawcze występowania bakterii z rodzaju *Rickettsia* w kleszczach w środowisku miejskim i naturalnym**

przygotowanej pod kierunkiem Promotor – dr hab. Anny Rymaszewskiej, profesor US.

z

Katedry Genetyki i Genomiki, Instytut Biologii, Uniwersytet Szczeciński

Podstawą wydania opinii jest pismo dr hab. Lidii Skuza, prof. US – Przewodniczącej Rady Naukowej Instytutu Biologii Uniwersytetu Szczecińskiego z dnia 26-go października 2023r. (BIO.4010.2.2023) i dokumentacja w postaci papierowej wersji pracy doktorskiej oraz na nośniku elektronicznym, nadesłane pocztą w dniu 3-go listopada 2023r.

Mgr Mariusz Piotrowski przedstawił do oceny pracę doktorską w postaci monografii pt.: "Urbanizacja a patogeny przenoszone przez kleszcze: studium porównawcze występowania bakterii z rodzaju *Rickettsia* w kleszczach w środowisku miejskim i naturalnym" obejmującej łącznie 190 stron maszynopisu, w układzie typowym dla dySSERTacji doktorskich. Tekst pracy został podzielony na 10 rozdziałów (1. **Wstęp** – 34 strony; 2. **Cel pracy** – 1 strona; 3. **Materiał i metody** – 8 stron; 4. **Wyniki** – 65 stron; 5. **Dyskusja** – 42 strony; 6. **Wnioski** – 2 strony; 7. **Streszczenie** w języku polskim – 1 strona; 8. **Summary**, streszczenie w języku angielskim – 1 strona; 9. **Wykaz prac naukowych powstałych podczas realizacji pracy doktorskiej** – 1 strona) i 10. **Literatura**, obszerny spis literatury zawarty na 28 stronach. Na początku pracy, za **Spisem treści**, Autor zamieścił również **Wykaz skrótów**. Praca posiada barwną szatę graficzną, została zilustrowana 35 rycinami, wśród których wyróżnić należy dokumentację fotograficzną miejsc i sposobu zbioru kleszczy jak również stadiów rozwojowych analizowanych pajęczaków. Praca zawiera w sumie 57 tabel, z czego 50 dotyczy zestawień uzyskanych wyników.

Podsumowując formalną ocenę recenzowanej rozprawy doktorskiej uważam, że posiada ona właściwą pracom doktorskim przejrzystą strukturę, została bardzo dobrze udokumentowana i jest napisana poprawnym językiem naukowym.

**ZNACZENIE PODJĘTEJ PROBLEMATYKI BADAWCZEJ**

Podjęte przez Doktoranta badania posiadają szerszy aspekt niż tylko aspekt poznawczy, mają charakter interdyscyplinarny mieszczący się w zakresie nauk biologicznych oraz nauk o zdrowiu. Riketsjozy odkleszczowe wywoływane są przez obligatoryjne wewnątrzkomórkowe Gram-ujemne bakterie zasiedlające głównie komórki śródbłonna naczyniowego i zaliczane są do grupy gorączek plamistych (ang. *Spotted Fever Group*, SFG). Należące do tej grupy i występujące na terenie naszego



kraju i państw ościennych *Rickettsia slovaca* i *R. raoultii* powodują limfadenopatie TIBOLA (ang. *Tick-Borne Lymphadenitis*) i DEBONEL (ang. *Dermacentor-Borne Necrosis Erythema Lyphadenopathy*). Natomiast potencjał patogenny *R. helvetica* i *R. monacensis* jest mniej znaczący, mogą bowiem powodować łagodną chorobę podobną do choroby przypominającej gorączkę plamistą. Riketsjozy należą do dawno poznanych chorób wektorowych ale rozprzestrzeniają się i w ostatnim czasie notuje się znaczący odsetek kleszczy zakażonych bakteriami z grupy SFG i obserwuje się wzrost zachorowalności na te zoonozy w regionie Europy Środkowej. W przypadku wielu riketsji występuje transmisja pionowa pomiędzy kleszczami, co sugeruje, że są one nie tylko wektorami, ale także naturalnymi rezerwuarami tych patogenów. Za rezerwuary uznaje się również, liczne gatunki kręgowców, w tym ptaki, gady czy ssaki. Człowiek jest zwykle zarówno dla kleszczy jak i dla przenoszonych przez nie riketsji żywicielem przypadkowym. Riketsjozy u ludzi mają najczęściej łagodny przebieg ale mogą manifestować się ciężkimi objawami a nawet prowadzić do śmierci osoby zakażonej. Stopień urbanizacji, występowanie dużych skupisk żywicieli kleszczy oraz postępujące ocieplenie klimatu sprzyjają wzrostowi populacji kleszczy a tym samym potencjalnemu wzrostowi transmisji patogenów odkleszczowych (w tym riketsji) na zwierzęta i ludzi. Ze względu na powyższe podjęta w rozprawie tematyka jest bardzo ważna, dotyczy współczesnych problemów zdrowotnych ludzi i zwierząt, związanych z mechanizmami rozprzestrzeniania się zoonotycznych chorób wektorowych i z epidemiologicznego punktu widzenia wpisuje się w nurt badań „One Health”. Dodatkowo, o wysokiej wartości merytorycznej przeprowadzonych przez Doktoranta badań świadczy fakt, że zostały one zaplanowane z największymi detalami i są kompleksowe. Autor dokonał 190 poborów kleszczy z dokładnie dobranych i opisanych stanowisk, równocześnie dokumentując poziom wilgotności i temperatury powietrza. W ciągu dwóch lat odłowu kleszczy na dziesięciu stanowiskach Doktorant pozyskał 1702 kleszczy, które poddał następnie analizom molekularnym – oprócz molekularnej identyfikacji bakterii z grupy SFG dokonał analizy filogenetycznej uzyskanych izolatów. Dodatkowo, po raz pierwszy zarejestrował obecność kleszcza *Dermacentor reticulatus* na terenach Wielkopolskiego Parku Narodowego i na terenach miejskich Poznania.

### ANALIZA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

1. Wstęp pracy podzielony został na trzy podrozdziały. W pierwszym z nich (1.1. **Riketsjozy jako nowo pojawiające się choroby zakaźne**) pan mgr Mariusz Piotrowski skupił się na charakterystyce poszczególnych riketsjoz oraz na czynnikach etiologicznych wywołujących te choroby. Przedstawił podział rodzaju *Rickettsia* na 4 grupy: AG (ang. Ancestral group), TG (ang. Typhus Group), TRG (ang. Transitional Group) i wspomnianą już powyżej SFG, przyporządkował im gatunki riketsji oraz omówił najważniejsze symptomy chorób, które wywołują. Na zakończenie podrozdziału wskazał słusznie na fakt, że: "Epidemiologia każdej riketsjozy przenoszonej przez kleszcze odzwierciedla dystrybucję geograficzną i sezonową aktywność wektorów kleszczowych oraz ich żywicieli zaangażowanych w przekazywanie tych patogenów."

W drugim podrozdziale (1.2. **Charakterystyka kleszczy**) Autor przedstawił systematykę rzędu *Ixodida* (kleszcze), skupiając się w dalszej części na kleszczach występujących w Polsce sklasyfikowanych do trzech rodzin: *Ixodidae*, *Amblyomidae* i *Argasidae*. Przedstawił tu rodzime, najpopularniejsze gatunki kleszczy występujących w Polsce *Ixodes ricinus* (kleszcz pospolity) i *D. reticulatus* (kleszcz łąkowy), wspominał również, że oprócz 19 gatunków rodzimych kleszczy, odnotowano do tej pory na terenie naszego kraju 15 gatunków obcych (na zwierzętach naturalnie migrujących lub sprowadzanych przez ludzi zwierzętach terraryjnych), co stanowi potencjalne zagrożenie pojawienia się nowych chorób odkleszczowych na terenie naszego kraju. W dalszej części podrozdziału (1.2.1. **Morfologia kleszczy**) Doktorant szczegółowo opisał morfologię kleszczy, rozmiary i budowę ciała, ubarwienie nienasyconych i nasyconych samic (Ryc. 3) i cechy różnicujące poszczególne stadia rozwojowe. Na uwagę zasługuje tu fakt, że Autor tę część pracy wzbogacił własnoręcznie wykonanymi zdjęciami stadiów rozwojowych



kleszczy *D. reticulatus* i *I. ricinus* i dokonał ich różnicującego zestawienia. Chociaż dla specjalistów odróżnienie dwóch najpospolitszych gatunków kleszczy w Polsce i ich stadiów rozwojowych nie jest rzeczą trudną, to już dla pozostałych czytelników dokumentacja fotograficzna może stanowić spore ułatwienie. Dalej (1.2.2. **Cykl rozwojowy kleszczy**) Autor scharakteryzował trójżywieliowy cykl rozwojowy kleszczy, który odgrywa kluczową rolę w krążeniu patogenów wśród kleszczy, zwierząt oraz ludzi. W tej części pracy Doktorant słusznie skupił uwagę na niezwykle istotnym i interesującym zagadnieniu dotyczącym możliwości rozprzestrzeniania się riketsji w populacjach kleszczy drogą zarówno transtadialną jak transowarialną i prawdopodobnie transspermalną, również podczas kopulacji na drodze kontaktu oralno-analnego i drogą hiperparazytyzmu (rzadkiego zjawiska żerowania kleszcza nienasyconego na nasyconym). W dalszej części pracy (1.2.3. **Żerowanie kleszczy**) Autor przedstawił strategię żerowania kleszczy dotyczące oczekiwania na żywiciela i jego identyfikacji, odbierania bodźców sensorycznych, mechanizmów przytwierdzenia kleszcza do ciała żywiciela i pobierania krwi oraz transmisji potencjalnych patogenów chorobotwórczych. W kolejnej części Wstępu (1.2.4. **Kleszcze jako wektory patogenów chorobotwórczych**) pan mgr M. Piotrowski szczególnie skupił się na patogennych gatunkach bakterii z rodzaju *Rickettsia* transmitowanych przez kleszcze *I. ricinus* i *D. reticulatus*. Wykaz patogenów i wektorów zestawił w Tabeli 3. Następnie Autor opisał czynniki decydujące o występowaniu kleszczy (1.2.5. **Występowanie kleszczy**), do których trafnie zaliczył odpowiednie warunki środowiskowe i dostępność odpowiednich żywicieli.

W ostatnim trzecim podrozdziale Wstępu (1.3. **Charakterystyka bakterii z rodzaju *Rickettsia***) Doktorant w szczegółowy sposób scharakteryzował bakterie z rodzaju *Rickettsia*. Po raz kolejny powrócił do podziału riketsji na cztery grupy: AG, SFG, TG i TRG. Ze względu na charakter podrozdziału uważam to za uzasadnione zwłaszcza, że grupy te zostały tu wnikliwiej scharakteryzowane. Wydaje się jednak za zbędne kolejne rozwinięcie skrótów w języku angielskim, którego Autor dokonał już w wykazie skrótów i w pierwszym podrozdziale Wstępu. Dalej Doktorant opisał biologię riketsji, które są obligatoryjnie wewnątrzkomórkowymi patogenami (1.3.1. **Biologia bakterii z rodzaju *Rickettsia***). Przedstawił tu w bardzo interesujący sposób przystosowania bakterii do zasiedlania komórek żywiciela min. "ruchliwość opartą na aktynie w procesie, w który, polimeryzują włókna aktynowe gospodarza na jednym biegunie powierzchni komórki bakteryjnej, umożliwiając przemieszczanie się w cytoplazmie gospodarza" oraz strategię zwiększania trwałości w liniach żywiciela poprzez manipulowanie jego zachowaniami rozrodczymi i fizjologią, do których zaliczył "zabijanie samców, indukcję partogenezy, niezgodność cytoplazmatyczną i feminizację męskich żywicieli". W kolejnej części Wstępu (1.3.2. **Budowa genomu bakterii z rodzaju *Rickettsia***) Autor opisał budowę genomu omawianych bakterii słusznie wskazując na fakt, że genomy bakterii z rodzaju *Rickettsia* są mniejsze, gdyż nie kodują genów licznych szlaków metabolicznych (takich jak glikoliza, glukoneogeneza, szlak pentozofosforanowy, synteza aminokwasów, nukleotydów czy witamin z grupy B) ze względu na pozyskiwanie niezbędnych składników odżywczych przez te bakterie bezpośrednio z zasiedlanych komórek organizmu żywicielskiego. Dalej (1.3.3. **Patogeneza bakterii z rodzaju *Rickettsia***) Doktorant opisał mechanizmy infekcji bakterii z rodzaju *Rickettsia*. Szczególnie interesujące są opisane tu przez Autora manipulacje regulacją komórek gospodarza wywołane przez zasiedlające bakterie poprzez modulację dynamiki błony, cytoszkieletu aktynowego, metabolizmu fosfoinozytolu, transportu wewnątrzkomórkowego i mechanizmów obrony immunologicznej, jak również etiologie i objawy "riketsjowego zapalenia naczyń" czy powikłania obserwowane w ciężkich przypadkach riketsjoz, wśród których Autor wymienił: śródmiąższowe zapalenie płuc, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenie mięśnia sercowego, zapalenie nerek oraz martwicę wątroby. W kolejnej części Wstępu (1.3.4. **Epidemiologia bakterii z rodzaju *Rickettsia***) Doktorant scharakteryzował chorobotwórcze gatunki z rodzaju *Rickettsia* oraz wywoływane przez nie objawy wykorzystując zestawienie tabelaryczne przygotowane na podstawie ukazanego w 2020r. artykułu przeglądowego własnego autorstwa (Piotrowski i Rymaszewska 2020). Dodatkowo, Autor zwrócił tu trafnie uwagę na nowe gatunki riketsji uważane za potencjalnie patogenne, których potencjał





chorobotwórczy nie został dotychczas potwierdzony. Na końcu Wstępu pracy (**1.3.5. Rozmieszczenie geograficzne bakterii z rodzaju *Rickettsia***) Doktorant skupił się na zasięgach geograficznych występowania riketsji, które słusznie powiązał z występowaniem odpowiednich wektorów, "różnorodnością i szybką ewolucją rozmieszczenia i zagęszczenia kleszczy oraz chorób, które przenoszą".

Podsumowując ocenę pierwszej części rozprawy doktorskiej należy podkreślić, że Wstęp pracy stanowi niezwykle szerokie i interesujące kompendium wiedzy na temat nie tylko samych bakterii z rodzaju *Rickettsia* ale również riketsjoz oraz wektorów i rezerwuarów tych chorób. Mgr Mariusz Piotrowski z ogromną starannością dokonał przeglądu literatury przedmiotu, zarówno tej najnowszej jak historycznej. Uważam, że Wstęp pracy bardzo dobrze informuje czytelnika o wadze podjętych badań i w pełni uzasadnia ich podjęcie przez Doktoranta.

2. Jako główny **Cel pracy** badawczej mgr Mariusz Piotrowski założył porównanie różnic w występowaniu bakterii z rodzaju *Rickettsia* w populacjach kleszczy w środowisku miejskim na obszarze Poznania i naturalnym obejmującym Wielkopolski Park Narodowy. W celu przeprowadzenia dogłębnej analizy zaplanowanych badań postanowił przeanalizować: stadia rozwojowe kleszczy pod kątem dostępności i wrażliwości na zakażenie patogenami, sezonową aktywność kleszczy, warunki środowiskowe wpływające na kształtowanie się układu kleszcz-patogen, środowisko miejskie i naturalne bytowania kleszczy, w których panujące warunki siedliskowe mogą wpływać na dynamikę zakażeń. Szczególnie ten ostatni aspekt wiąże się z wskazanym przez Autora celem pośrednim pracy, a mianowicie analizą potencjalnego ryzyka zdrowotnego dla ludzi i zwierząt związanego z obecnością bakterii chorobotwórczych z rodzaju *Rickettsia*. Takie podejście Doktoranta na etapie planowania badań w szczególności wpisuje się w założenia współczesnych badań z nurtu "One Health". Dodatkowo, zakładaną hipotezę badawczą Autora była teza o braku zależności pomiędzy odsetkami zakażonych kleszczy a powyższymi czynnikami, którą poddał weryfikacji.

3. W rozdziale **Materiały i metody** pan mgr Mariusz Piotrowski opisał punkty zbioru kleszczy (**3.1. Teren badań**) na terenie miasta Poznania (PO-1: Jezioro Rusałka, PO-2: Jezioro Strzeszyńskie, PO-3: Jezioro Maltanskie, PO-4: Park Cytadela, PO-5: Rzeką Warta) oraz na terenie Wielkopolskiego Parku Narodowego (PZ-1-5). Charakterystykę stanowisk wraz z dokładnym położeniem geograficznym zestawiał w przejrzystych tabelach (Tabela 5 i 6, odpowiednio). Dodatkowym atutem tej części rozdziału jest dokumentacja fotograficzna miejsc zbioru kleszczy (Ryc. 9 i 10). W podrozdziale **3.2. Zbiór kleszczy** Doktorant dokładnie opisał proces zbioru kleszczy metodą flagowania a także metodę pomiaru temperatury i wilgotności. Udokumentował to w postaci zdjęć wykonanych w trakcie zbierania kleszczy, do których dołączył opracowaną kartę danych zbioru pajęczaków, gdzie zapisywał wszystkie dane środowiskowe. W kolejnych dwóch podrozdziałach Autor opisał metody izolacji DNA z kleszczy (**3.3. Izolacja DNA z kleszczy**) oraz detekcji materiału genetycznego riketsji (**3.4. Detekcja bakterii z rodzaju *Rickettsia***). W podrozdziale **3.5. Sekwencjonowanie** przedstawił natomiast sposób doboru dodatnich prób uzyskanych podczas amplifikacji fragmentu genu syntazy cytrynianowej *gltA* do sekwencjonowania, który wymagał przeprowadzenia dodatkowych reakcji PCR z użyciem markerów *ompA* i ITS. Łącznie firmie MacroGen (Holandia) zlecono sekwencjonowanie 32 prób, w tym dodatnich dla *gltA* i ITS, ale ujemnych dla *ompA* (*R. helvetica*), dodatnich dla *gltA* i *ompA* oraz z amplikonem ITS o 150 nukleotydów krótszym niż dla *R. helvetica* (*R. monacensis*), dodatnich dla *gltA* i *ompA* ale ujemnych dla ITS (*R. raoultii*), dodatnie dla wszystkich zastosowanych markerów ze standardową wielkością amplikonów, które reprezentowały poszczególne stanowiska zbioru oraz wszystkie dodatnie próby uzyskane w przypadku kleszczy *D. reticulatus*. Metody analizy statystycznej przedstawione w kolejnym podrozdziale (**3.6. Analiza statystyczna**) zostały dobrane prawidłowo a przyjęty poziom istotności  $\alpha = 0,05$  umożliwił Doktorantowi wykazanie różnic statystycznie istotnych przy  $p \leq 0,001$ . Jest to wysoki poziom istotności zakładany zwykle w przypadku badań z zakresu nauk medycznych.



4. W rozdziale **Wyniki** mgr Mariusz Piotrowski w uporządkowany sposób zestawiał rezultaty przeprowadzonych analiz. Na początku rozdziału (**4.1. Sezonowa aktywność kleszczy**) przedstawił zestawienie kleszczy zebranych w latach 2018–2019 oraz w środowisku naturalnym i miejskim. Zestawienia tego dokonał w dwóch tabelach (Tab. 8 i 9). Moim zdaniem Autor mógł zamieścić tylko jedną z tabel, ponieważ w każdej z nich dostępne są dane liczbowe zebranych kleszczy w zależności poszczególnych lat (2018/2019) jak i rodzaju środowiska (naturalne – Wielkopolski Park Narodowy/miejskie – Poznań). W dalszych częściach rozdziału Autor zaprezentował analizy i zestawienia występowania kleszczy w zależności od terenu odłowu (**4.1.1.**) i od stadium rozwojowego (**4.1.2.**), występowania kleszczy w czasie i przestrzeni (**4.1.3.**), gdzie dokonał zestawień tabelarycznych zbioru kleszczy wraz z określeniem stadium rozwojowego w poszczególnych miesiącach dla wszystkich badanych stanowisk. Dokonał również analizy występowania kleszczy w zależności od warunków środowiskowych (**4.1.4.**), przedstawiając schematycznie zależności między ilością kleszczy zebranych na poszczególnych stanowiskach i w określonych miesiącach w odniesieniu do parametrów środowiskowych zanotowanych podczas zbioru pajęczaków. W drugim podrozdziale Wyników (**4.2. Molekularna identyfikacja bakterii z rodzaju *Rickettsia***) Autor przedstawił najważniejsze wyniki uzyskanych analiz. W wyniku badań molekularnych wśród 1702 odłowionych kleszczy wykazał u 220 osobników obecność materiału genetycznego bakterii z rodzaju *Rickettsia*, co stanowiło 12,9% wszystkich analizowanych prób. Obecność DNA bakterii Doktorant wykazał w 216 na 1692 kleszcze *I. ricinus* (12,8%) i w 4 na 10 odłowionych kleszczy *D. reticulatus* (40%). Liczba i odsetek zakażonych kleszczy były wyższe dla kleszczy zebranych w Wielkopolskim Parku Narodowym (153/989; 15,5%) niż na terenach miejskich Poznania (67/713; 9,4%), znamienność tych różnic nie była jednak statystycznie istotna. W kolejnej części rozdziału Wyniki (**4.2.1. Występowanie bakterii z rodzaju *Rickettsia* w zależności od terenu odłowu kleszczy**) Autor zwrócił uwagę na fakt występowania zmienności patogenów w różnych okresach czasu w Wielkopolskim Parku Narodowym np. generalnie w roku 2019 zidentyfikowano w kleszczach odłowionych na terenach naturalnych o 1,3% więcej patogenów niż w roku 2018, jednak w przypadku niektórych stanowisk Autor obserwował tendencje odwrotną (PZ-4). Natomiast w przypadku kleszczy odłowionych na terenie Poznania w okresie dwuletnim Doktorant zanotował niemal identyczną liczbę prób *Rickettsia*-pozytywnych (9,6% i 9,3%, odpowiednio w 2018 i 2019 roku). Niezwykle interesujące wydaje się spostrzeżenie Autora, że na stanowisku PO-3 (Jezioro Maltańskie), na którym liczba kleszczy była najwyższa spośród wszystkich badanych stanowisk, wykazano materiał genetyczny riketsji aż w 47 kleszczach, co było wynikiem zbliżonym do najwyższego wyniku w WPN. Z drugiej strony Doktorant wykazał na stanowisku PO-5 (Rzeka Warta), gdzie zebrano najmniejszą liczbę kleszczy, najwyższy odsetek zakażonych kleszczy (17,1%), przekraczające wskaźniki uzyskane dla terenów naturalnych. Widzimy więc, że chociaż generalnie odsetek zakażonych kleszczy był wyższy na terenach WPN, to analiza wyników uzyskanych dla niektórych stanowisk zlokalizowanych na terenie Poznania wydaje się temu zaprzeczać. W dalszej części pracy (**4.2.2. Występowanie bakterii z rodzaju *Rickettsia* w zależności od stadium rozwojowego kleszczy**) Autor przedstawił niezwykle ważne wyniki dotyczące występowania riketsji w różnych stadiach rozwojowych. Zanotował niższy odsetek zakażeń stadium nimfy (średnio 14,8% w okresie dwuletnim) niż osobników dorosłych kleszczy (28% samice i 28,2% samce) w WPN. Na terenach miejskich Poznania zaobserwował natomiast bardziej wyrównany poziom zakażeń u poszczególnych stadiów rozwojowych kleszczy. Dalej (**4.2.3. Występowanie bakterii z rodzaju *Rickettsia* w kleszczach w czasie i przestrzeni**) Autor przedstawił wyniki analizy zakażenia kleszczy bakteriami z rodzaju *Rickettsia* w zależności od miesiąca zbioru i wykazał, że "poziom zakażenia w różnych stadiach rozwojowych kleszczy praktycznie pokrywa się z profilem aktywności kleszczy na danym obszarze". W ciągu dwóch lat badań Autor notował zakażenia kleszczy w każdym miesiącu, najniższy odsetek zakażonych pajęczaków obserwował w kwietniu oraz we wrześniu i październiku, kiedy poziom zakażeń spadał lub osiągał poziom zerowy. Moim zdaniem najbardziej interesujące wyniki pan mgr Mariusz Piotrowski przedstawił na końcu rozdziału (**4.2.4. Gatunki bakterii z rodzaju**





**Rickettsia występujące w kleszczach**) dotyczące identyfikacji gatunkowej riketsji. Doktorant porównał uzyskane 32 sekwencje z sekwencjami zdeponowanymi w Gen Bank i wykazał 100% podobieństwa do sekwencji zarejestrowanych w bazie jako *R. helvetica*, *R. monacensis* i *R. raoultii*. Niezwykle istotnym osiągnięciem niniejszych badań było wykazanie, że identyfikacja wszystkich 32 przeanalizowanych sekwencji była zgodna z pierwotnymi założeniami Autora o możliwości identyfikacji gatunkowej riketsji na poziomie reakcji PCR – DNA *R. helvetica* wykryto w próbach dodatnich dla *gltA* i ITS, ale ujemnych dla *ompA*; materiał genetyczny *R. monacensis* wykryto w próbach dodatnich dla genów *gltA* i *ompA* oraz amplikonem ITS o 150 nukleotydów krótszym niż dla *R. helvetica*; DNA *R. raoultii* wykryto w próbach dodatnich dla *gltA* i *ompA* ale ujemnych dla ITS. Dzięki analizie uzyskanych sekwencji Autor wykazał obecność *R. helvetica* w 20 kleszczach *I. ricinus* a *R. monacensis* w 8 zarówno na terenach naturalnych jak i miejskich. W 4 kleszczach *D. reticulatus* odłowionych w WPN zanotował obecność DNA *R. raoultii*. Warto również zauważyć, że podczas analizy filogenetycznej Doktorant wykazał, że dwie zdeponowane w Banku Genów sekwencje zarejestrowane przez innych autorów (KY937992 i MT365092) zostały niepoprawnie oznaczone jako *Rickettsia aeschlimannii*, w rzeczywistości wykazujące 100% podobieństwo do *R. raoultii*. Zgodność wyników metod analizy sekwencji i identyfikacji gatunkowej riketsji z wykorzystaniem markerów *gltA*, *ompA* i ITS umożliwiła Autorowi dokonanie identyfikacji gatunkowej 220 prób *Rickettsia*-pozytywnych w kleszczach – odsetek zakażonych kleszczy *R. helvetica* wynosił 14,9% w WPN i 9,1% w Poznaniu; *R. monacensis* – 0,6% w WPN i 0,3% w Poznaniu. *R. raoultii* Doktorant zidentyfikował zaś u 2 samic i 2 samców kleszczy *D. reticulatus* w dwóch lokalizacjach na terenach WPN.

5. W rozdziale **Dyskusja** Autor umiejętnie przedyskutował wyniki własnych badań na tle licznych polskich i światowych doniesień literaturowych w odpowiednich podrozdziałach (5.1. **Występowanie kleszczy**: 5.1.1. Zmiany w rozmieszczeniu kleszczy, 5.1.2. Zmiany w sezonowej aktywności kleszczy, 5.1.3. Występowanie kleszczy w środowisku miejskim i naturalnym; 5.2. **Obecność bakterii z rodzaju Rickettsia w populacjach kleszczy**: 5.2.1. Występowanie bakterii z rodzaju *Rickettsia* w środowisku miejskim i naturalnym, 5.2.2. Identyfikacja molekularna bakterii z rodzaju *Rickettsia*; 5.3. **Zagrożenia zdrowotne występowania bakterii z rodzaju Rickettsia**). Chociaż podział Dyskusji na podrozdziały nie jest częsty w dysertacjach doktorskich, to w tym przypadku jest w pełni uzasadniony ze względu na mnogość diskutowanych zagadnień. Dzięki temu przebieg Dyskusji jest uporządkowany i merytoryczny. Jest to dowód na to, że Doktorant jest dojrzałym i wnikliwym pracownikiem naukowym. Chciałabym również zauważyć, że rozdział Dyskusja jest nie tylko merytoryczny ale również niezwykle ciekawy i stanowi jedną z najbardziej wartościowych części przedstawionej do oceny pracy.

6. W rozdziale **Wnioski** Autor zaprezentował aż w 11 punktach najważniejsze osiągnięcia pracy doktorskiej. Skracając wnioski Doktoranta można przedstawić je następująco: 1. Kleszcze występują liczniej na obszarach naturalnych WPN niż na terenach miejskich Poznania; 2. Czynnikiem wpływającym na pojawienie się kleszczy jest przede wszystkim dodatnia temperatura, która inicjuje sezonową aktywność tych pasożytów; 3. Istnieje jeden szczyt aktywności kleszczy, który występuje w okresie wiosenno-letnim; 4. W środowisku naturalnym dominującym stadium rozwojowym była nimfa podczas gdy na stanowiskach miejskich przewaga nimf nie występowała na wszystkich obszarach; 5. Dominującym gatunkiem kleszcza na badanym terenie był *I. ricinus*; 6. Bakterie z rodzaju *Rickettsia* występowały u obu badanych gatunków kleszczy *I. ricinus* i *D. reticulatus* zarówno w środowisku naturalnym jak i miejskim; 7. Zaobserwowano cyklicznie niższy poziom zakażenia kleszczy bakteriami z rodzaju *Rickettsia* w kwietniu w przypadku WPN i w maju na terenach miejskich Poznania; 8. Na badanym obszarze zanotowano występowanie trzech patogennych dla ludzi gatunków riketsji – *R. helvetica* i *R. monacensis* w kleszczach *I. ricinus* zarówno na obszarze naturalnym jak i miejskim oraz *R. raoultii* w kleszczach *D. reticulatus* wyłącznie na obszarze WPN; 9. Zastosowanie metody identyfikacji gatunków riketsji opartej na reakcjach PCR z wykorzystaniem markerów *gltA*, *ompA* i ITS



pozwoiliło na wykazanie jej 100% skuteczności w zestawieniu z metodą sekwencjonowania; **10.** Biorąc pod uwagę wyższy stopień prewalencji kleszczy *Rickettsia* spp. w porównaniu z innymi patogenami chorobotwórczymi, ilość rejestrowanych przypadków riketsjoz w Polsce jest niedoszacowana; **11.** Mimo wyższej prewalencji *Rickettsia* spp. na obszarach naturalnych, warto uwzględnić obszary miejskie w monitorowaniu chorób przenoszonych przez kleszcze oraz w kampaniach zdrowotnych.

Ze względu na obszerny charakter przeprowadzonych badań i mnogość uzyskanych wyników taka duża ilość wniosków jest uzasadniona. Z drugiej jednak strony poszczególne wnioski są dość rozbudowane i w moim przekonaniu ten rozdział pracy należało zatytułować **Podsumowanie i wnioski**. Niemniej jednak wnioski są prawidłowe, wnikliwie i dobrze przemyślane.

**7. i 8.** Na końcu pracy Autor zamieścił jednostronicowe **Streszczenie** w języku polskim i angielskim, które w syntetyczny sposób uwypukla najważniejsze osiągnięcia pracy doktorskiej.

**9.** Manuskrypt zawiera również **Wykaz prac naukowych powstałych podczas realizacji pracy doktorskiej**. Autor wymienił tu trzy publikacje, które ukazały się w latach 2020-2022 w czasopiśmie *Microorganisms Pathogens* i *Acta Parasitologica*. Czwarta praca została złożona do redakcji czasopisma *Experimental and Applied Acarology*. W dwóch pracach Doktorant jest pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym, w dwóch kolejnych drugim autorem. Wszystkie wymienione czasopisma znajdują się na liście JCR. Łączny Impact Factor opublikowanych prac jest wysoki i wynosi IF = 9,734. Prace te wg Bazy Web of Science Core Collection były cytowane już aż 42 razy. Świadczy to o istotności podjętych problemów badawczych i o bardzo dobrym przygotowaniu Doktoranta do pracy naukowej.

**10.** Rozdział **Literatura** jest obszerny i obejmuje łącznie 307 pozycji. Prawie wszystkie pozycje są angielskojęzyczne. Chociaż wykaz literatury został przygotowany starannie, to zauważalny jest fakt braku zastosowania kursywy przy większości gatunkowych nazw łacińskich.

Podsumowując, przedstawiona do oceny praca doktorska posiada dużą wartość merytoryczną, ma charakter interdyscyplinarny a uzyskane wyniki pozwoliły wypełnić założone cele i w zasadzie trudno wskazać w stosunku do niej jakiegokolwiek zarzuty, poza bardzo nielicznymi błędami natury redakcyjnej, które z pewnością zostaną skorygowane przez Autora przy przygotowaniu tekstu do publikacji.

Niemniej jednak chciałabym prosić o ustosunkowania się Doktoranta do następujących pytań i sugestii podczas obrony:

1. Czy sprawdzano jakość i ilość izolowanego DNA z kleszczy (np. spektrofotometrycznie, fluorometrycznie czy elektroforetycznie)?
2. Czy zdeponowano lub planuje się zdeponować uzyskane sekwencje *Rickettsia* spp. w Gen Bank?
3. Proszę wyrazić opinię, czy w przypadku obligatoryjnie wewnątrzkomórkowych patogenów jakimi są gatunki bakterii z rodzaju *Rickettsia* i wobec obecnie istniejących definicji pasożytnictwa można zamiennie używać wyrażen bakterie – gospodarz oraz pasożyt – żywiciel?
4. Czy wobec narastającej populacji i zwiększania zasięgów występowania kleszczy *D. reticulatus* w Polsce można się spodziewać większej zachorowalności ludzi na limfadenopatie spowodowane riketsjozami w naszym kraju i dlaczego?
5. Chociaż riketsjozy są jednymi z najstarszych chorób odkleszczowych, określa się je mianem chorób nowo rozprzestrzeniających się lub wręcz nowo pojawiających się. Czy zdaniem Doktoranta jest to poprawne i dlaczego?
6. Czy udało się Doktorantowi zaobserwować podczas pracy badawczej zjawisko hiperparazytyzmu u kleszczy czy międzygatunkowe kontakty płciowe pomiędzy samcami *I. ricinus* i samicami *D. reticulatus*, o których wspomina w pracy?



Wyżej wymienione uwagi, pytania czy sugestie nie umniejszają wartości merytorycznej niniejszej dysertacji oraz bardzo wysokiej oceny, jaką z pełną odpowiedzialnością stawiam pracy doktorskiej pana mgra. Mariusza Piotrowskiego. Są one wynikiem jedynie ciekawości i powinności recenzenta oraz chęci dyskusji z Doktorantem podczas publicznej obrony.

#### PODSUMOWANIE I WNIOSKI KOŃCOWE

W świetle wszystkich powyższych argumentów stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji Dysertacja doktorska pt.: **"Urbanizacja a patogeny przenoszone przez kleszcze: studium porównawcze występowania bakterii z rodzaju *Rickettsia* w kleszczach w środowisku miejskim i naturalnym"** autorstwa mgra. Mariusza Piotrowskiego stanowi oryginalne opracowanie w postaci monografii, wnosi znaczący wkład w rozwój dyscypliny i spełnia wszystkie wymogi formalne i merytoryczne stawiane pracom doktorskim oraz odpowiada warunkom określonym w art. 187, ust. 1-3 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668) i może być podstawą do nadania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplinie nauki biologiczne.

**W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Biologii Uniwersytetu Szczecińskiego o dopuszczenie mgra. Mariusza Piotrowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Praca charakteryzuje się dużą wartością poznawczą, szerokim zakresem badań i wykorzystanych metod badawczych, posiada interdyscyplinarny charakter i wpisuje się we współczesny nurt badań "One Health". Mimo różnorodności użytych metod i mnogości uzyskanych wyników, napisana jest poprawnym językiem i posiada uporządkowaną, przejrzystą strukturę. Świadczy to o dużej dojrzałości, samodzielności naukowej i badawczej Doktoranta zarówno w części laboratoryjnej jak podczas pisania pracy, dobrego przygotowania metodycznego oraz pracowitości i rzetelności Badacza. Potwierdza to także wartościowy dotychczasowy dorobek publikacyjny Doktoranta.

**Biorąc pod uwagę powyższe przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Biologii Uniwersytetu Szczecińskiego wniosek o wyróżnienie niniejszej dysertacji doktorskiej stosowną nagrodą.**

Małgorzata Dmitryjuk





Olsztyn, dnia 20.11.2023r.

**Dr hab. Małgorzata Dmitryjuk, prof. UWM**

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski

Wydział Biologii i Biotechnologii

Katedra Biochemii

ul. Oczapowskiego 1A

10-719 Olsztyn

[m.dmit@uwm.edu.pl](mailto:m.dmit@uwm.edu.pl)

Sz. Pani

**Dr hab. Lidia Skuza, prof. US**

PRZEWODNICZĄCA

Rady Naukowej Instytutu Biologii

Uniwersytetu Szczecińskiego

W odpowiedzi na pismo BIO.4010.2.2023 w sprawie powołania mnie na recenzenta pracy doktorskiej **mgra. Mariusza Piotrowskiego** pt.: „Urbanizacja a patogeny przenoszone przez kleszcze, studium porównawcze występowania bakterii z rodzaju *Rickettsia* w kleszczach w środowisku miejskim i naturalnym”, po wnikliwej analizie nadesłanej w dniu 3 listopada 2023r. dokumentacji, przekazuję recenzję powyższej dysertacji.

Moja ocena jest jednoznacznie pozytywna.

*Dr hab. Małgorzata Dmitryjuk, prof. UWM*