

**dr hab. Grzegorz Karbowski, prof. IP PAN**  
**Instytut Parazytologii im. Witolda Stefańskiego PAN**  
**ul. Twarda 51/55, 00-818 Warszawa**

**Ocena rozprawy doktorskiej pani mgr Ewy Gajdy pt. „Charakterystyka molekularna i ekologiczna Anaplasmataceae występujących w populacjach dziko żyjących gryzoni”**

W przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej p. mgr Ewy Gajdy „Charakterystyka molekularna i ekologiczna Anaplasmataceae występujących w populacjach dziko żyjących gryzoni” postawiono sobie za cel opis ekstensywności zakażenia pospolitych gryzoni występujących Polsce, przez riketsję *Anaplasma phagocytophilum* i przez to określić ich rolę w cyklu zoonotycznym anaplazmozy. Drugim celem było sporządzenie charakterystyki molekularnej wykrytych szczepów. Jako cel dodatkowy obrano diagnostykę ich zarażeń przez inne pasożyty występujące we krwi. Wyniki pracy mają więc z założenia znaczenie epidemiologiczne, a także przyczynią się do poszerzenia i uzupełnienia wiedzy podstawowej.

Wybór tematu badawczego uważam za trafny – autorce udało się znaleźć interesującą „lukę” w parazytologii. Rozprawa dotyczy patogenów bardzo powszechnie występujących na półkuli północnej, a mimo to wciąż nie do końca poznanych. W Europie dwa gatunki z rodziny Anaplasmataceae mają potencjalne znaczenie epidemiologiczne – *Anaplasma phagocytophilum*, riketsja wywołująca u człowieka chorobę anaplazmozę granulocytarną, oraz *Candidatus Neohrlichia micurensis*, riketsja także zdolna do zakażenia człowieka. Dla obydwu tych gatunków wektorem jest kleszcz pospolity *Ixodes ricinus*, a rezerwuarem dzikie ssaki. I to są jedyne pewne informacje na temat struktury ich ognisk zoonotycznych. Dalsza wiedza jest fragmentaryczna lub opiera się na spekulacjach wymagających udowodnienia. Cykle życiowe ich poszczególnych genomogatunków opisane są fragmentarycznie, cechy biologiczne także znane są tylko powierzchownie. Za rezerwuar zoonotyczny *Candidatus Neohrlichia micurensis* uważa się małe gryzonie, głównie z rodziny Arvicolinae. Kwestia rezerwuaru zoonotycznego *A. phagocytophilum* jest znacznie bardziej skomplikowana, ze względu na istnienie całego szeregu genomogatunków i szczepów, wszystkich przenoszonych przez kleszcza pospolitego, ale różniących się preferencjami względem kręgowca, i patogennością dla człowieka. Nie wiadomo, ile ich dokładnie jest i jakie jest ich rozmieszczenie geograficzne. Wyróżniane są na podstawie amplifikacji metodą PCR

sekwencji czterech różnych genów - 16S rRNA, *ankA*, *groESL*, *msp2*, oraz genu *msp4*. Analiza dostępnych publikacji różnych Autorów pozwala je zebrać w przynajmniej trzy grupy, których krążenie w środowisku przebiega w odmiennych cyklach. Pierwszy obejmuje szczepy patogenne dla człowieka, i ich rezerwuarem zoonotycznym są konie, jeże i ssaki drapieżne. Druga grupa obejmuje szczepy niepatogenne dla człowieka, ale patogenne dla domowych przeżuwaczy, a ich rezerwuarem są jeleniowate. Trzeci cykl obejmuje szczepy niepatogenne, krążące w populacji dzikich gryzoni. O nich najmniej wiadomo, i tym właśnie szczepom Autorka postanowiła przyjrzeć się bliżej.

Rozprawa ma klasyczny podział na rozdziały – wstęp, założenia pracy i charakterystykę jej obiektu, materiały i metody, wyniki i omówienie wyników. Zgodnie z wymogami formalnymi zawartymi w Art. 13, p. 6 Ustawy o Stopniach i Tytułach Naukowych (Dz. U. Nr 65, poz. 595), Autorka zamieściła streszczenie rozprawy w języku angielskim.

Wstęp zawiera przedstawienie roli gryzoni jako rezerwuaru zoonotycznego wielu chorób transmisyjnych człowieka. W uzasadnieniu wyboru celu badań Autorka podkreśla, że w ostatnich latach obserwuje się wzrost liczby zachorowań na choroby transmisyjne. Zarysowuje się tutaj wstęp do przedstawienia struktury zoonotycznej ognisk chorób transmisyjnych przenoszonych przez stawonogi. Na strukturę zoonotyczną składają się trzy komponenty – wektor efektywny, rezerwuar zoonotyczny i amplifier. Struktura ta przedstawiana jest i analizowana w szeregu prac przeglądowych (Siński E. 1999, *Wiadomości Parazytologiczne* 45: 135-142; Humair et al. 1999, *Parasitology* 118: 33-42; Karbowski et al. 2015, *Annals of Parasitology* 61: 221-228). Szkoda, że Autorka nie przedstawiła tego ogólnego schematu, ponieważ byłby bardzo pomocny w dyskusji otrzymanych wyników. Tym bardziej, że w opisie *A. phagocytophilum* zwraca uwagę na prace zespołu Jahfari i wsp. (2014), w której zostały wyodrębnione 4 ekotypy *A. phagocytophilum* związane z różnymi grupami kręgowców, w tym jeden ekotyp związany z gryzoniami. Uzupełnieniem wstępu są dokładne opisy pozostałych patogenów, których rezerwuarem są gryzonie - *Candidatus Neoehrlichia micurensis*, grupa *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Borrelia miyamotoi*, riketsje z rodzaju *Rickettsia*, oraz *Coxiella burnetii*.

Rozdział drugi zawiera podane w skrócie założenia pracy, oraz zadania szczegółowe wiodące do określonego we wstępie celu.

W rozdziale trzecim opisane zostały szczegółowo materiały i metody. Metodyka badań jest prawidłowo dobrana do założonych celów. Obejmuje nowoczesne metody oparte o techniki biologii molekularnej i genetyki – metody amplifikacji wybranych genów z wykorzystaniem reakcji PCR, klonowaniem oraz sekwencjonowanie otrzymanych

fragmentów DNA. W tym rozdziale zamieszczono również charakterystykę wybranych do badań gatunków gryzoni – myszy polnej, myszy leśnej i nornicy rudej, która moim zdaniem powinna się znaleźć we wstępie, obok opisu patogenów. Na uwagę zasługuje zastosowanie nowatorskiej metody diagnostycznej z wykorzystaniem metody wysoko-przepustowego PCR, która umożliwi jednoczesną diagnostykę badanej próbki w kierunku wielu patogenów. Opisy przebiegu reakcji klasycznego PCR oraz nested-PCR, w tym sekwencji starterów i warunków reakcji zrobione zostały bardzo szczegółowo, i mogą dzięki temu zostać powtórzone przez innych badaczy. Cennym punktem jest próba porównania skuteczności diagnostyki z wykorzystaniem dwóch potencjalnych prób – krwi i śledziony.

Do tego rozdziału mogę mieć tylko kilka małych zastrzeżeń. Zbędna tutaj jest informacja, w jakim laboratorium dana część pracy była wykonywana, np., że badania prowadzone metodą Q-PCR były prowadzone podczas Training School. Punkty te można było zamieścić na stronie z podziękowaniami. Nie podane zostały również kryteria takiego doboru gatunków gryzoni do badań ani wybranych lokalizacji. Czy na podstawie wcześniejszych badań pilotażowych? Czy występujących w określonym środowisku, chociaż to kryterium można podważyć gdyż myszy leśna i polna preferują odmienne środowiska? Czy wytypowano na podstawie danych z literatury?

Rozdział „Wyniki” zawiera opis rezultatów przeprowadzonych obserwacji i badań. Złożony jest głównie z tabel i wykresów, z załączonymi krótkimi komentarzami, które z reguły umożliwiają pełne ich zrozumienie. W podrozdziale 4.1.1. ukazano wynik badań kierunku jednoczesnego zarażenia myszowatych różnymi patogenami. W rozdziale tym pojawiła się piroplazma *Babesia microti* u jednej myszy polnej. Pasożyt ten został pominięty w dalszych częściach pracy. Dlaczego? Nie ma także rozdziału zbadanych gryzoni na płcie, co także mogłoby dać ciekawe wyniki – różnica w ekstensywności zarażenia pasożytami samic, samców i różnych grup wiekowych żywicieli stosunkowo często jest spotykana w parazytologii. Podrozdział 4.2.1. przedstawia wyniki diagnostyki w kierunku zakażenia *A.phagocytophilum*, z wykorzystaniem starterów amplifikujących fragmenty genu *msp2*, oraz w dalszej kolejności analogicznie operonu *groESL*, *msp4*, 16S rRNA.

Podrozdział 4.3. podaje wyniki drugiego etapu badań, których celem było potwierdzenie obecności Anaplasmataceae, wykazanej w pierwszym etapie. Wybrane do tych badań zostały próbki wykazujące wynik pozytywny w badaniach przesiewowych. Patogeny zostały wykryte u wszystkich trzech badanych gatunków, z przewagą nornicy rudej. Wykazano także różnice lokalne. Nie stwierdzono zakażenia u gryzoni pochodzących ze

stanowiska Wrocław-Osobowice, natomiast wysoka ekstensywność zaobserwowana została u gryzoni z rezerwatów Stawy Milickie i Mokry Dwór.

Podrozdział 4.4. zawiera wyniki badań w kierunku wykrycia pozostałych, poza *A.phagocytophilum*, patogenów. Przedstawiono ekstensywność zakażenia u wszystkich trzech badanych gatunków gryzoni, i identyfikację na bazie otrzymanych sekwencji fragmentów genów, przez porównanie z dostępnymi sekwencjami w Banku Genów.

Podrozdział 4.4.1.5 poświęcony został koinfekcjom. Koinfekcję trzema patogenami stwierdzono tylko dwa razy – u myszy polnej i normicy rudej. Koinfekcje dwoma patogenami były częstsze, w tym przeważały *C.N.mikurensis*, u myszy polnej.

W podrozdziale 4.4.1.6 uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, z wykorzystaniem testu  $\chi^2$ .

Ciekawe spostrzeżenie z analizy wszystkich części – wyniki badań prób krwi i próbek śledzion pobranych od jednego osobnika często się nie pokrywają. O ile nie jest to zaskoczeniem w przypadku *Borrelia burgdorferi* oraz *Rickettsia* spp, które we krwi normalnie nie występują, to ma znaczenie w przypadku *Anaplasma phagocytophilum*, bytującej w granulocytach. Odwrotnie było w przypadku *B. miyamotoi*. Prawidłowość ta została potwierdzona testem statystycznym. Autorka nie próbuje wyjaśnić tych zjawisk, zresztą bez przeprowadzenia innych szczegółowych badań, np. histologicznych byłyby to tylko spekulacje.

W rozdziale 5 otrzymane wyniki zostały skonfrontowane z literaturą. Wnioskiem ogólnym było wykazanie, że najczęściej zwierząt zakażonych wykryto na terenie zurbanizowanym, co ma znaczenie epidemiologiczne. Autorka wykazała, że *A.phagocytophilum* stosunkowo rzadko była wykazywana u gryzoni w Europie, i tylko jednorazowo w Polsce. *C.N.mikurensis* w Polsce jeszcze u gryzoni nie wykrywano.

Cennym fragmentem jest próba powiązania występowania *A.phagocytophilum* u gryzoni z występowaniem kleszcza gryzoniowego *Ixodes trianguliceps*, który według wielu Autorów ma być przenosicielem tego kladu. Nie jest do końca prawdą twierdzenie Autorki, że jest to pospolity pasożyt gryzoni w całej Polsce. Powołuje się, co prawda na pracę przeglądową Autorów Nowak-Cmura i Siuda z 2012 roku, gdzie takie twierdzenie faktycznie padło, ale w pracy tej są również informacje o ograniczeniach w jego występowaniu, i preferencji do terenów górzystych. Na terenie Polski północno-wschodniej jest to gatunek przynajmniej bardzo rzadki. Drugi odnośnik dotyczył badań Kiewry i Modrzejewskiej z lat 2002-2003, prowadzonych w Masywie Ślęży, czyli na innym terenie i w innym środowisku. Na różnice środowiskowe wskazują prace Haitlingera nad składem fauny ektopasożytów

małych ssaków w Polsce południowo-zachodniej. Wykazana została obecność kleszcza gryzoniowego u małych ssaków w Górach Sowich i Paśmie Babiogórskim (Haitlinger 1977, Polskie Pismo Entomologiczne 47:429-92; Haitlinger 1989, Acta Zoologica Cracoviensis 32:15-56), natomiast nie znaleziono tego kleszcza u gryzoni łowionych na obszarze Wrocławia (Haitlinger 1986, Acta Parasitologica Polonica 28: 259-273; Haitlinger 1989, Acta Parasitologica Polonica 34: 45-66). W tym miejscu trzeba by zauważyć, że bardzo brakuje informacji o składzie fauny ektopasożytów na gryzoniach, które były badane podczas prezentowanej pracy. Jeżeli prawidłowości wykazane w powyższych artykułach by się powtarzały, wtedy być może okazałoby się, że Autorka wykryła *A.phagocytophilum* na terenie, gdzie kleszcz gryzoniowy nie występuje. W tym punkcie odniosę się do mojej poprzedniej uwagi, że Autorka nie przedstawiła modelu ogniska zoonotycznego anaplazmozy. Na jego tle byłoby dobrze widoczne, że patogen, wektor i ssak będący rezerwuarem zoonotycznym stanowią razem jeden układ, ściśle związany ze środowiskiem, i należy je badać i analizować łącznie.

Mankamentem tej części rozprawy jest powtórzenie niektórych ogólnych informacji, już zamieszczonych we wstępie -- np. wyróżnienie 4 ekotypów w pracach Jahfari i wsp. (2014). Informacja ta zamieszczona jest we wstępie na stronie 7 oraz w dyskusji na stronie 90. Nadmiar zbędnych informacji utrudnia zrozumienie interpretacji uzyskanych podczas pracy wyników.

Rozdział 6 „Podsumowanie i wnioski” zawiera streszczone na trzech stronach najważniejsze rezultaty badań i ich interpretację, które w rzeczy samej pozwalają na szybką pozytywną ocenę rozprawy. Autorka powtarza więc informację o wykryciu patogenów u drobnych ssaków z terenów województwa dolnośląskiego, w tym podkreśla wykazanie po raz pierwszy w Polsce ich zakażenie przez *Candidatus N. mikurensis*, i znaczenie wykrycia zakażenia przez *Anaplasma phagocytophilum*.

Zbędny w tym rozdziale jest punkt 3 – „Praca miała na celu przetestowanie różnych fragmentów genów (...) w tkankach dziko żyjących gryzoni”. Cele wymieniane były w rozdziale drugim. Odpowiedź na to pytanie rozproszona jest w omówieniu wyników, a na druga część pytania częściowo ukazana w tym rozdziale w punkcie 17. Za to w punkcie 17 Autorka nie podała, że przypadku zakażeń wywoływanych przez Anaplasmataceae bardziej przydatne są próbki śledzion, co wykazane jest w rozdziale 4.3 i w tabelach 57 i 58.

Rozdziały 7 i 8 zawierają streszczenia rozprawy po polsku i po angielsku, zawierające zarys problemu, analizę wyników i ich znaczenie epidemiologiczne.

Rozdziały 9, 10 i 11 zawierają wykaz rycin, tabel i wykresów.

Spis piśmiennictwa zawiera 127 pozycji, jest więc obszerny i przyuszczalnie wyczerpujący.

Autorka nie ustrzegła się w całości pracy drobnych usterek, typowych dla szerokich opracowań, zaznaczę jednak, że są to tylko pojedyncze literówki i przestawienia znaków. Nie mają znaczenia dla wartości merytorycznej pracy, tym bardziej, że całość napisana jest poprawnym i starannym językiem, bez błędów stylistycznych i terminologicznych. Uwagę przykuwa tylko zwrot „kleszcze i inne roztocza” na stronie 4. Prawidłowa polska nazwa jednostki taksonomicznej brzmi „roztocze”, natomiast „roztocza” oznaczają w ekologii grupę organizmów saprofitycznych, zresztą coraz częściej teraz nazywanych destruentami.

W podsumowaniu oceny stwierdzam, że przedstawiona mi rozprawa wnosi do parazytologii cenne informacje o epidemiologii riketsjoz wywoływanych przez Anaplasmataceae, a pierwsze stwierdzenia badanych patogenów u gryzoni i w Polsce powinny być jak najszybciej opublikowane w liczących się czasopismach.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska p. mgr Ewy Gajdy pt. „Charakterystyka molekularna i ekologiczna Anaplasmataceae występujących w populacjach dziko żyjących gryzoni” spełnia warunki stawiane przed rozprawami doktorskimi i może być dopuszczona do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 11.12.2018 r.

