



Warszawa, dn. 21.11.2018

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

Przedmiot rozprawy i jego naukowe znaczenie

Badania przedstawione w rozprawie doktorskiej Pani mgr Ewy Gajdy miały na celu określenie roli gryzoni w utrzymywaniu w środowisku naturalnym i podmiejskim dwóch gatunków bakterii wektorowanych przez kleszcze- *Anaplasma phagocytophilum* (Ap) i *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* (CNM). W tym celu zastosowano techniki biologii molekularnej do wykrywania i identyfikacji zakażenia w dwóch typach tkanek pozyskanych od gryzoni, we krwi i w śledzionie. Dodatkowo, w próbach z 2014 roku doktorantka oznaczyła zakażenie innymi istotnymi dla zdrowia publicznego patogenami (*Borrelia* spp, *Rickettsia* spp.) co pozwoliło na wykrycie koinfekcji z Anaplasmataceae.

Przedmiot rozprawy wpisuje się w światowe trendy badań nad patogenami wektorowanymi przez kleszcze, których znaczenie wzrasta globalnie wraz ze stale rosnącą liczbą zachorowań wśród ludzi i zwierząt. W eko-epidemiologii chorób wektorowanych przez kleszcze, obok badań zakażenia kleszczy, badania nad rezerwuarem zoonotycznym patogenów mają kluczowe znaczenie, gdyż pozwalają zrozumieć drogi zakażenia kleszczy i zaplanować sposoby kontroli populacji kleszczy i ich zakażenia. Gryzonie, jako główni żywiele postaci młodocianych kleszcza pospolitego *Ixodes ricinus*, i liczebnie najpowszechniejsza grupa ssaków, są zazwyczaj typowane jako główne źródło zakażenia dla kleszczy.

Autorka rozprawy skupiła się na dwóch patogenach, dla których rezerwar zoonotyczny nie jest do końca rozpoznany (Ap, CNM) i trzech gatunkach gryzoni, włączając obok nornicy rudej także dwa gatunki słabiej przebadanych myszerek- myszarkę polną *Apodemus agrarius* i myszarkę leśną *A. flavicollis*. W mojej opinii przedmiot rozprawy ma duże naukowe znaczenie, a badania przeprowadzone przez doktorantkę poszerzyły znacząco zasób wiedzy odnośnie roli trzech gatunków gryzoni jako rezerwuaru Ap i CNM. Znaczenie uzyskanych wyników wspiera szeroki warsztat metodyczny, poszukiwanie najlepszych procedur i markerów genetycznych do wykrywania zakażeń, realizowany we współpracy z zagranicznymi ośrodkami i naukowcami o wysokiej renomie.

Formalny opis rozprawy

Rozprawa doktorska mgr Ewy Gajdy została wykonana w Zakładzie Parazytologii Instytutu Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Promotorem rozprawy była Pani prof.

dr hab. Anna Okulewicz a promotorem pomocniczym Pani dr Joanna Hildebrand. Rozprawa ma postać klasyczną, składa się z pięciu rozdziałów typowych dla badawczych prac naukowych (wstęp, wyodrębnione cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja), zaopatrzona jest w streszczenia w języku polskim i angielskim, które może byłoby lepiej umieścić na początku tezy, oraz spisy tabel, wykresów i rycin, i spis literatury (127 pozycji i strony internetowe). Dodatkowo zawiera rozdział 6 „Podsumowanie i wnioski”, który zawiera raczej streszczenie w punktach celów i najważniejszych wyników rozprawy (niektóre wartości procentowe są prezentowane tu po raz pierwszy), i moim zdaniem stanowi raczej konspekt, na którym można by oprzeć przebieg dyskusji wyników i formułowanie ostatecznych wniosków.

Ocena merytoryczna

Badania prowadzono w latach 2013 i 2014 na czterech stanowiskach na obszarze Dolnego Śląska: na dwóch stanowiskach w okolicach Wrocławia i na dwóch na/w pobliżu obszarów chronionych (rezerwat Stawy Milickie, otulina Ślęzańskiego Parku Krajobrazowego).

Ogółem odłowiono i przebadano 354 gryzoni należące do trzech gatunków (myszarka leśna i polna, nornica ruda), przy czym większość stanowiły osobniki myszarki polnej (n=158). Do badań pobrano ogółem 276 prób krwi i 354 próby śledziony.

Głównym celem pracy była molekularna detekcja zarażenia dwoma gatunkami bakterii z rodziny Anaplasmataceae, *A. phagocytophilum* (Ap) i *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* (CNM). W tym celu przetestowano i zastosowano szereg markerów genetycznych (msp2, msp4, 16S rDNA, gltA, groESL) i szereg technik detekcji/protokołów (real-time PCR, PCR i nested PCR, PCR na chipie, multiplex PCR), w połączeniu z sekwencjonowaniem i analizą produktów PCR.

Autorka miała też na celu porównanie detekcji w dwóch typach prób, krwi i śledzionie. Dodatkowo, w części prób oznaczono zarażenie innymi istotnymi z punktu widzenia zdrowia publicznego patogenami, takimi jak *Borrelia burgdorferi* s.l., *Rickettsia* spp. czy *Coxiella burnetii*. Pozwoliło to na wykrycie u gryzoni koinfekcji badanymi patogenami.

Mocną stroną badań doktorantki są bardzo ciekawe, nowe i cenne wyniki dotyczące zarażenia trzech gatunków gryzoni CNM. Bardziej niejednoznaczne wyniki uzyskano z badań nad zakażeniem Ap w badanych próbach. W przypadku *A. phagocytophilum*, pozytywne wyniki potwierdzone sekwencjonowaniem uzyskano dla trzech prób z 2013 roku (ekstensywność ok. 1%), natomiast uzyskano znacznie wyższe odsetki prób PCR-pozytywnych, których niestety nie udało się potwierdzić sekwencjonowaniem, zarówno w badaniach wstępnych (10 prób pozytywnych na 21 [lub 42- jeśli wynik podano dla sumy prób krwi i śledziony z 21 osobników]), jak i w pierwszym etapie badań (ekstensywność ogólna 7-10% w próbach krwi i śledzion, nawet do 21% u myszarki leśnej *A. flavicollis*). Należy podkreślić, że doktorantka starała się potwierdzić swoje wyniki wykorzystując inne markery genetyczne (16S rDNA, groESL, gltA), niestety bez powodzenia, uzyskując wynik negatywny dla wszystkich prób z 2014 roku.

W przypadku CNM doktorantka uzyskała bardzo podobne odsetki zakażenia dla prób z 2013 roku (22 i 27%, dla krwi i próbek śledzion) i 2014 roku (24 i 33%, dla krwi i śledzion), wykazując iż wszystkie trzy przebadane gatunki gryzoni mogą stanowić istotny rezerwuuar tego patogenu. Doktorantka przeanalizowała znaczącą liczbę uzyskanych sekwencji (28+3=31 z 2013 roku, 47 z 2014 roku). Szkoda, że dla prób z 2014 roku badania oparto na bardzo krótkim fragmencie genu gltA (podane w tekście są dwie długości: 233 lub 274 pz), który nie

pozwała na jednoznaczne rozróżnienie CNM od *Ehrlichia walkerii* (identyczne pokrycie i % homologii wg opisu autorki ze str. 72).

Pośród pozostałych oznaczeń interesujące i wartościowe są wyniki dotyczące rozpowszechnienia zakażeń *Borrelia afzelii* i *B. miyamotoi* u badanych gatunków gryzoni. Wykazano, że wszystkie gatunki gryzoni mogą stanowić rezerwuuar *B. miyamotoi* i potwierdzono rolę gryzoni jako rezerwuuaru *B. afzelii*, a także w badaniach wstępnych uzyskano trzy próby pozytywne dla *B. spielmanii*. Ze względu na rosnącą liczbę zachorowań na boreliozę i BMD, uzyskane przez mgr Ewę Gajdę wyniki mają duże znaczenie dla zdrowia publicznego. Dodatkowo, autorka potwierdziła zakażenie *Rickettsia helvetica* u dwóch myszerek polnych, odłowionych w 2014 roku. Wyniki dotyczące zakażenia *R. felis-like* i *Coxiella burnetii* należy interpretować z dużą ostrożnością, ponieważ prawidłowa klasyfikacja otrzymanych wyników wymaga przeprowadzenia jeszcze analiz filogenetycznych (dla *Rickettsia*) lub potwierdzenia prób PCR-pozytywnych sekwencjonowaniem (dla *C. burnetii*). Jest to szczególnie ważne w dobie wzrostu zainteresowania problemem bakterii endosymbiotycznych kleszczy. Ostatnie badania wskazują, że kleszcze posiadają własne, niepatogenne dla ludzi szczepy bakterii jedynie genetycznie podobne do *Francisella* czy *C. burnetii* (*Francisella*- lub *Coxiella*-like).

Uwagi. Moim obowiązkiem jako recenzenta jest wskazanie niedociągnięć, a przez ich eliminację- możliwości udoskonalenia rozprawy i przygotowania wyników do publikacji.

Obecny układ prezentacji wyników nie ułatwia oceny wyników. Brakuje zbiorczych tabel, które pozwoliłyby na zestawienie i porównanie uzyskanych wyników z dwóch lat badań i dwóch zestawów próbek (krew, śledziona) oraz zbiorczej ekstensywności zakażeń. Do prezentacji wyników na wykresach nie zastosowano wskaźnika zakażenia- odsetka zakażeń (ekstensywności czyli prewalencji zarażenia) lecz przedstawiono surowe wyniki w postaci liczebności grup zakażonych i niezakażonych osobników. Autorka podaje najpierw odsetki prób pozytywnych dla połączonych 'zbiorów': krew plus śledziona; następnie odsetki oddzielnie dla dwóch typów tkanek, potem odsetki dla osobników, które wyszły pozytywne z obu prób tkanek, a w ostatniej kolejności prezentuje wyniki (liczby prób pozytywnych) dla danej grupy gryzoni, ocenione na podstawie wyniku dla jednej lub drugiej próbki. To ostatnie podejście ma najwięcej sensu biologicznego, ponieważ nie ma obecnie żadnych dowodów na to, która z tkanek gryzoni najlepiej nadaje się do oznaczeń zakażeń Anaplasmataceae, a więc otrzymanie jakiegokolwiek wyniku pozytywnego dla śledziona lub krwi powinno klasyfikować osobnika jako zakażonego.

Ekstensywność zakażenia (%) jest prezentowana dopiero w Podsumowaniu. Wyniki analiz statystycznych są przedstawione w osobnym rozdziale, bez powiązania z prezentowanymi na wykresach wynikami, nie wiadomo więc, które z widocznych różnic są istotne statystycznie. Wyniki analiz statystycznych nie powinny stanowić odrębnego rozdziału wyników, gdyż metody statystyczne są jedynie narzędziem do oceny istotności różnic pomiędzy badanymi wskaźnikami. Obecny sposób przedstawienia wyników analiz jest niekompletny. Nie są podane konkretne liczbowe wyniki, np. informacja o istotnych różnicach w zakażeniu gryzoni CNM z różnych stanowisk: nie wiadomo czy odnosi się do wykresu 7 czy 11, czy do ogólnych prewalencji uzyskanych dla danych zsumowanych z lat 2013 i 2014. W opisie wyników statystycznych pojawiają się wskaźniki, np. 'bogactwo gatunkowe hemopasożytów' nie opisane w metodyce ani nie prezentowane w rozdziale Wyniki.

Wydaje się, że autorka postawiła na prezentację wyników wg kolejności i sposobu ich uzyskania, co wynikało zapewne z różnej metodyki stosowanej w kolejnych latach badań. Z

mojego punktu widzenia praca zyskałaby na zebraniu i prezentacji zbiorczych wyników (najpierw w postaci bazy Excel, w której do każdego gryzonia przypisano by wyniki oznaczeń wykonanych różnymi metodami/protokołami a następnie w postaci tabel zbiorczych, prezentujących ekstensywność zakażenia, np. w próbach krwi, w próbach śledziony oraz łącznie- krwi i/lub śledziony). W obecnym układzie wydaje się, że wyniki uzyskane w badaniach wstępnych (PCR na chipie dla ponad 30 gatunków patogenów) nie zostały połączone z wynikami z etapu I, pomimo że dotyczą tych samych próbek z 2013 roku.

Słabością różnych protokołów PCR stosowanych w pierwszym etapie badań (i częściowo w drugim) jest uzyskanie krótkich sekwencji fragmentów genów (200-300 pz), które mogą być niewystarczające do identyfikacji gatunków i genotypów patogenów, a także nie nadają się do analiz filogenetycznych.

Z kolei dla próbek z 2014 roku zastosowano zupełnie inne, dobrze przemyślane podejście: przesiewowy qPCR a następnie konwencjonalny PCR dla prób pozytywnych, wraz z sekwencjonowaniem otrzymanych produktów (w większości o długości wystarczającej i do identyfikacji gatunku/genotypu i do analiz filogenetycznych). Zastanawiam się, czemu tej metodyki nie zastosowano do powtórnego przebadania prób z 2013 roku? Pozwoliłoby to na lepsze porównanie wyników.

Metody molekularne są wyczerpująco opisane w metodyce lecz mniej dokładnie opisane w wynikach. Jednym z głównych braków jest niepodawanie % homologii (lub zakresu % homologii) przy podawaniu informacji o identyfikacji konkretnych gatunków patogenów dla uzyskanych izolatów. Dane o % homologii/podobieństwie analizowanych sekwencji konsensusowych do sekwencji z bazy GenBank są podawane sporadycznie, a są przecież kluczowe dla oceny prawidłowości identyfikacji rodzajów/gatunków wykrywanych patogenów. W opisie II etapu badań nie są podane wyniki przesiewowych qPCR, co jednak wydaje się bardzo istotne i wpływało na liczbę prób badanych w dalszej kolejności konwencjonalnym PCR.

Doradzałabym zdeponowanie uzyskanych w drugim etapie badań sekwencji konsensusowych w bazie GenBank, gdzie nie tylko recenzenci rozprawy, ale i wszyscy zainteresowani tematyką mogliby obejrzeć uzyskane wyniki.

Inne uwagi. Sposób cytowania i wybór prac źródłowych. W pracy naukowej każde stwierdzenie powinno być podparte odpowiednią pracą źródłową. Cytowane prace lepiej podawać na początku danego akapitu, gdyż po przeczytaniu całego paragrafu (np. pierwsza strona wstępu) nie wiadomo, czy cytowane prace odnoszą się do wszystkich faktów cytowanych, czy jedynie do ostatnich podawanych informacji. Są w rozprawie stwierdzenia nie poparte cytacjami, np. o pierwszym wykryciu *B. miyamotoi* u kleszczy z Japonii lub o wykryciu pierwszej infekcji *B. miyamotoi* u człowieka w Rosji (str. 11). Z analizy cytowanych prac wynika, że autorka cytuje informacje ze wstępów innych prac, zamiast prac oryginalnych, co także jest niedociągnięciem. Należy cytować oryginalne prace, z szacunku dla autorów danych odkryć naukowych. Cytowanie zaledwie kilku prac przy opisie szerokiej tematyki (np. Rizzoli i wsp. 2014, Kiewra 2014) sugerować może niedostateczną znajomość literatury przedmiotu badań.

Duplikowanie wyników: niektóre wyniki są podawane zarówno w tekście, jak i w tabelach i na wykresach, np. odsetek prób pozytywnych w próbkach krwi i próbkach śledziony. W tym wypadku zupełnie wystarczą dane w tekście i tabelach, nie ma potrzeby przedstawiania tych dwóch liczb po raz trzeci w postaci dwóch słupków (np. wykresy 1, 5, 9).

Brak omówienia wyników z tabel i wykresów: nie wystarczy informacja, iż jakieś dane znajdują się w tabeli lub na wykresie. Należy opisać/wskazać najważniejszy wynik.

Szczególnie słabo są opisane wykresy przedstawiające zakażenie danym patogenem u poszczególnych gatunków gryzoni z poszczególnych stanowisk (wykresy 4, 8, 12, 16, 20). Dyskusja- jest to bardzo obszerny rozdział. Myślę, że dyskusja zyskałaby na płynności i prowadziła do jednoznacznych wniosków, gdyby została skrócona przynajmniej o połowę. Ten rozdział zawiera zbyt wiele informacji ogólnych, znacznie lepiej pasujących do wstępu (w części replikuje informacje zawarte we wstępie, np. odnośnie ogólnych informacji o badanych patogenach i ich znaczeniu). Znacznie łatwiejszy byłby w odbiorze, gdyby autorka zaczęła od podkreślenia swoich najważniejszych osiągnięć/odkryć, a następnie przedyskutowała w odniesieniu do nich konkretne odsetki, gatunki, rozprzestrzenienie, itp. Drobne uwagi: niekonsekwentne skracanie nazw rodzajowych, np. *Anaplasma*, *Ixodes*, *Myodes*; wyrażenia potoczne: 'łapki' zamiast pułapki; 'wyciek z kolumny' zamiast przesącz; stosowanie zamiennie groEL i groESL.

Podsumowanie i wniosek końcowy

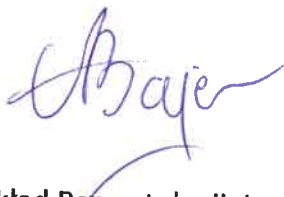
Rozprawa doktorska Pani mgr Ewy Gajdy dotyczy istotnej problematyki badawczej, a uzyskane wyniki pozwoliły na znaczące poszerzenie wiedzy na temat roli trzech gatunków drobnych gryzoni jako rezerwuaru *A. phagocytophilum*, *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* i *Borrelia* spp.

Pomimo pewnych niedociągnięć w opracowaniu i prezentacji wyników, prawidłowo zastosowane metody badawcze pozwoliły na uzyskanie wartościowych i przekonujących wyników.

Na szczególne docenienie zasługuje szeroki zakres technik biologii molekularnej wykorzystany przez doktorantkę do przeprowadzenia oznaczeń i staranna optymalizacja metodyki PCR.

Podsumowując, stwierdzam że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Ewy Gajdy spełnia wymagania określone odpowiednimi przepisami, w związku z tym wioskuję do Rady Wydziału o dopuszczenie mgr Gajdy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Anna Bajer, Prof. UW



Zakład Parazytologii, Instytut Zoologii,
Wydział Biologii UW
Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa