



Wrocław, 09.11.2018 r.

dr hab. Dorota Kiewra

Zakład Ekologii Drobnoustrojów i Ochrony Środowiska

Instytut Genetyki i Mikrobiologii

Uniwersytet Wrocławski

ul. S. Przybyszewskiego 63, 51-148 Wrocław

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Patrycji Opalińskiej

pt. „Znaczenie sarny europejskiej (*Capreolus capreolus* L.) jako rezerwuaru patogenów chorób odkleszczowych”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Patrycji Opalińskiej została wykonana pod kierunkiem promotora dr hab. Magdaleny Nowak-Chmury, prof. Uniwersytetu Pedagogicznego w Krakowie oraz promotora pomocniczego dr Marka Asmana ze Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.

Prowadzone przez dr hab. prof. UP Magdalenę Nowak-Chmurę badania od wielu lat koncentrują się na biologii i ekologii nie tylko krajowej ale też światowej fauny kleszczy (Ixodida). Tematyka badawcza dr Marka Asmana obejmuje natomiast badania skupiające się na roli kleszczy w rozprzestrzenianiu chorób transmisyjnych. Rozprawa doktorska Pani mgr Patrycji Opalińskiej wpisuje się w te zagadnienia i poszerza aktualny stan wiedzy w zakresie poznania związków i środowiskowych uwarunkowań rozprzestrzeniania kleszczy, ich żywicieli oraz zoonotycznych patogenów. Podjęta tematyka jest szczególnie istotna w aspekcie notowanego w ostatnich dekadach wzrostu zachorowalności na choroby odkleszczowe, a także z uwagi na coraz większą różnorodność patogenów wykrywanych również w krajowych populacjach kleszczy. Autorka przedstawionej do oceny rozprawy koncentruje się szczególnie na badaniu udziału sarny europejskiej *Capreolus capreolus* w rozprzestrzenianiu populacji kleszczy oraz jej roli w utrzymywaniu ognisk patogenów chorób odkleszczowych. W przeprowadzonych badaniach Doktorantka uwzględniła dwa typy ekologiczne sarny europejskiej i ich udziału w utrzymywaniu populacji kleszczy w środowisku leśnym i polno-łąkowym, jak również udziału

tego żywiciela kleszczy w rozprzestrzenianiu wybranych patogenów chorób odkleszczowych. Przeprowadzone badania obejmowały trzy ważne z medycznego i weterynaryjnego punktu widzenia patogeny, tj. wywołujące boreliozę bakterie *Borrelia burgdorferi*, powodujące anaplazmozę bakterie *Anaplasma phagocytophilum* oraz pierwotniaki *Babesia microti* będące czynnikiem etiologicznym babeszjozy. Prowadzenie tego typu badań na określonym terenie jest szczególnie istotne zarówno w aspekcie naukowym, wyjaśniającym związki w układzie wektor – patogen – żywiciel, jak i praktycznym, zmierzającym do podejmowania działań zapobiegających rozprzestrzenianiu chorób odkleszczowych.

Rozprawa doktorska jest dziełem oryginalnym, obejmuje 99 stron, w tym 24 tabele, 10 rycin oraz 2 załączniki. Układ pracy spełnia wymogi stawiane pracom eksperymentalnym. Całość została podzielona na 12 rozdziałów, z których 3 zawierają podział na podrozdziały. Wstęp mógłby być, moim zdaniem, pierwszym rozdziałem, obejmującym podrozdziały od 1.1 do 1.4, a kolejnymi rozdziałami zawarte w rozprawie cele pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, literatura oraz streszczenia w języku polskim i angielskim, spisy tabel i załączników.

We „Wstępie” Autorka zwięźle nakreśliła przedmiot swoich badań i częściowo uzasadniła wybór podjętego tematu. Wskazała na ważną rolę lasu w życiu i gospodarce człowieka jednocześnie podkreślając złożoność tego ekosystemu. Zwróciła także uwagę na zmiany środowiskowe wpływające na rozprzestrzenienie populacji saren i kleszczy. Podkreśliła ponadto znaczenie epidemiologiczne kleszczy i rolę saren jako rezerwuaru patogenów.

W kolejnych podrozdziałach rozdziału zatytułowanego „Przegląd literatury” Autorka prześledziła aktualny stan wiedzy w zakresie występowania pasożytów zewnętrznych sarny ze szczególnym uwzględnieniem kleszczy, dokonała ogólnej charakterystyki biologii i ekologii kleszczy, skutków ich pasożytowania, a także dotychczasowych badań udziału sarny w podtrzymywaniu ognisk chorób odkleszczowych. Szczególnie cenne jest zwrócenie uwagi na obecność dwóch typów ekologicznych saren, tj. saren bytujących na terenach leśnych oraz saren żyjących na terenach polno-łąkowych, w aspekcie ich odmienności i zróżnicowanego narażenia na ataki kleszczy. Cenne jest również podkreślenie znaczenia kleszczy, szczególnie kleszczy pospolitych *Ixodes ricinus*, jako pasożytów zewnętrznych sarny. Wśród innych istotnych ektopasożytów sarny Doktorantka wymieniła i omówiła owady, w tym m.in. należące do muchówek, pospolicie występującego na terenie całego kraju strzyżaka *Lipoptena cervi*, a także pasożytujące na sarnach wszoły *Damalinia meyeri*, wszy *Solenopotes capreoli* i gzy *Hypoderma diana*; natomiast wśród roztoczy, oprócz kleszczy, Autorka zwróciła uwagę na świerzbowce. W podrozdziale dotyczącym cech pasożytnictwa i specyficzności żywicielskiej kleszczy Doktorantka pogłębiła zagadnienia związane z biologią kleszczy, ich cyklem rozwojowym, występowaniem,

aktywnością, specyficznością żywicielską. Następnie zwróciła uwagę na bezpośrednie skutki pasożytowania kleszczy oraz ich wektorową rolę. Wartościowe jest podkreślenie zróżnicowanej roli żywicieli, w tym jeleniowatych, w możliwości podtrzymywania ognisk występowania patogenów. Przy omawianiu rezultatów dotychczas prowadzonych badań, w tym m.in. udziału sarny w utrzymywaniu populacji kleszczy czy wskazaniu zooprofilaktycznej roli jeleniowatych w przypadku *Borrelia burgdorferi* s.l. oraz rezerwuarowej roli dla *Anaplasma phagocytophilum*, pewien niedosyt budzi brak podkreślenia konieczności prowadzenia systematycznych, monitoringowych badań w lokalnych, zróżnicowanych warunkach, co jest przedmiotem recenzowanej rozprawy.

W rozdziale zatytułowanym „Cele pracy” Autorka szczegółowo określiła zaplanowane zadania badawcze obejmujące zarówno faunistyczne badania kleszczy (w tym badanie składu gatunkowego kleszczy pasożytujących na sarnie, struktury ich populacji, lokalizacji na żywicielu, ekstensywności i intensywności zarażenia), jak i molekularną detekcję patogenów w kleszczach oraz w krwi i w śledzionie saren.

Piętnastostronicowy rozdział „Materiał i metody” obejmuje charakterystykę terenu badań z uzasadnieniem jego wyboru, charakterystykę sarny europejskiej (choć ten opis, moim zdaniem, można było zawrzeć we wstępie pracy), następnie zawiera dokładny opis metod zbioru kleszczy z roślinności i żywicieli oraz ich oznaczania, a także metodę pozyskiwania tkanek żywicieli. W dalszej części Autorka przedstawiła szczegółowy opis przeprowadzonych badań molekularnych, w tym metody izolacji DNA, warunki łańcuchowej reakcji polimerazy PCR i nested PCR dla każdego z analizowanych patogenów oraz metodę rozdziału elektroforetycznego produktu i jego wizualizacji. W rozdziale tym Doktorantka opisała również wykorzystywane metody statystyczne.

Najobszerniejszym rozdziałem pracy jest rozdział „Wyniki”, który zajmuje 30 stron. W kolejnych podrozdziałach Autorka w sposób czytelny i wiarygodny dokumentuje wyniki uzyskane w poszczególnych etapach badań. Warto podkreślić, że badaniami w kierunku obecności kleszczy objęto 160 saren bytujących zarówno w ekosystemach polnych, jak i leśnych, reprezentowanych równomiernie przez osobniki męskie i żeńskie. Dostęp do tylu żywicieli i pozyskanie z nich nie tylko kleszczy, ale również prób krwi i śledzion wymagało niemałego wysiłku i dużego zaangażowania Doktorantki. Na podkreślenie zasługuje również fakt, iż badania saren prowadzone były bardzo systematycznie, w obydwóch analizowanych ekosystemach i obejmowały sezon wiosenny i zimowy zarówno w roku 2015, jak i 2016. W trakcie tych dwóch lat, zarówno w sezonie wiosennym jak zimowym, zebrano z żywicieli imponującą liczbę ponad 1600 okazów kleszczy, które przyporządkowano do dwóch gatunków: dominującego, stanowiącego ponad 99%, kleszcza pospolitego *Ixodes ricinus* i występującego sporadycznie (<1%) kleszcza jeżowego *Ixodes*

hexagonus. Większość kleszczy (ponad 70%) została pozyskana z saren bytujących w ekosystemie leśnym, natomiast sarny ekosystemu polnego infestowane były rzadziej. Szczegółowe wyniki zbioru, precyzyjnie dokumentujące cały wykonany zbiór, przedstawiono w tabelach (7-14). Bardzo wartościowe jest uwzględnienie szeregu parametrów, w tym okresu zbioru (wiosna/zima, rok badań), płci sarny, występowania kleszczy na określonej części ciała, a także takich parametrów jak: intensywność i ekstensywność zarażenia. Istotnym uzupełnieniem przeprowadzonych badań żywicieli jest pozyskanie kleszczy z roślinności. Autorka odłowiała z terenów występowania sarny europejskiej ponad 850 aktywnych kleszczy, które przyporządkowała do dwóch gatunków: dominującego kleszcza pospolitego *I. ricinus* (99,9%) i odławianego sporadycznie kleszcza łąkowego *Dermacentor reticulatus* (0,1%). Co ważne, Autorka statystycznie potwierdziła większą aktywność kleszczy na terenach leśnych niż łąkowych, co jest w zgodzie z otrzymanymi wynikami dotyczącymi poziomu intestacji sarny europejskiej na analizowanych terenach.

Za bardzo wartościowe uważam objęcie badaniami molekularnymi w kierunku obecności patogenów zarówno kleszczy, w tym zebranych z sarny europejskiej i odłowionych z roślinności, jak też krwi oraz śledzion żywicieli. Taka analiza umożliwia bowiem w sposób kompleksowy wyjaśnienie zależności między patogenem, wektorem a żywicielem. Co więcej tego typu badania wskazywać również mogą na zagrożenie chorobami odkleszczowymi na danym terenie. Autorka objęła badaniami aż trzy patogeny, tj. bakterie *Borrelia burgdorferi* i *Anaplasma phagocytophilum* oraz pierwotniaki *Babesia microti*. Wprawdzie brak wykrycia *Borrelia burgdorferi* zarówno w kleszczach pospolitych zebranych z roślinności, jak i z żywicieli uniemożliwia jednoznaczne potwierdzenie zooprofilaktycznej roli sarny w rozprzestrzenianiu krętków boreliozy, to jednocześnie wskazuje na niski poziom zagrożenia tą zoonozą na badanym terenie. Natomiast wykazanie obecności *A. phagocytophilum* w zarówno tkankach saren (tj. w krwi i śledzionie) jak również w żerujących kleszczach potwierdza znaczącą rolę *Capreolus capreolus* w krążeniu tych bakterii. Co więcej wskazuje na zagrożenie infekcją tym patogenem na badanym terenie. Wykrycie obecności *Babesia microti* zarówno w tkankach badanego żywiciela, jak i kleszczach wskazywać może na udział saren w cyklu krążenia tego pierwotniaka. W przypadku szacowania występowania *B. microti* warto podkreślić, że badania saren jako potencjalnego rezerwuaru tej piroplazmozy na analizowanych terenach, tj. obszarach leżących w województwie wielkopolskim, wykonano po raz pierwszy. Wykazanie obecności choć jednego z badanych patogenów u ponad jednej trzeciej kleszczy zebranych z saren oraz w ponad 50% badanych tkanek pobranych od żywiciela jednoznacznie wskazuje na znaczenie sarny europejskiej w krążeniu patogenów transmitowanych przez kleszcze w województwie wielkopolskim. Ważnym aspektem przeprowadzonych badań jest też wykrycie koinfekcji, tj. jednoczesnego występowania *A. phagocytophilum* i *B. microti* w

tkankach saren, zarówno w śledzionie, jak i krwi. Świadczyć to może o potencjalnej możliwości przekazywania nawet odległych filogenetycznie patogenów do kleszcza w czasie jednokrotnego żerowania.

Istotną częścią rozprawy jest „Dyskusja”, w której Autorka starała się wszechstronnie analizować uzyskane wyniki konfrontując je z danymi literaturowymi. W sposób dojrzały tłumaczy występujące różnice zwracając równocześnie uwagę na znaczenie własnych dokonań.

Rozdział „Wnioski” zawiera 7 punktów, które w sposób skrótowy i zwięzły przedstawiają najważniejsze konkluzje wynikające z przeprowadzonych badań i podjętej dyskusji.

W spisie literatury Autorka uwzględniła ponad 160 prac, w tym anglojęzyczną literaturę z ostatnich lat.

Przedstawiona do recenzji rozprawa została przygotowana starannie, jest dobrze zredagowana i napisana poprawnym językiem, choć Autorka nie ustrzegła się pewnych niedociągnięć. Z obowiązku recenzenta jestem zobligowana do ich wskazania. W przedstawionej do recenzji rozprawie znalazłam nie do końca precyzyjne czy logiczne sformułowania (np. str. 13: „...żywiciiele żyją przemieszczając się”, czy str. 67: „Obecność tych pierwotniaków w organizmie sarny może świadczyć o potencjalnej roli tego gatunku w podtrzymywaniu krążenia tej riketsji ...”), są one jednak nieliczne i nie wpływają na czytelność pracy. Również na czytelność pracy nie wpływają drobne błędy językowe (jak np. na str. 16, 30 „ilość kleszczy” zamiast „liczba kleszczy”; nie zawsze prawidłowe umiejscowienie przecinków, nawiasu; dużej litery [str. 74 - tytułu czasopisma; str. 77 – „and”]; nie zawsze właściwa pisownia kursywą [np. str. 17 – B. jako *Borrelia*, str. 32, 33 – zbędna kursywa przy „s.l.”]; brak twardej spacji co spowodowało łamanie tekstu w miejscu oddzielającym liczbę od symbolu jednostki [str. 31]). Warto w cytowanej literaturze przy podawaniu redaktora i tytułów książek zachować tą samą kolejność, tj. podawać konsekwentnie w pierwszej kolejności nazwiska redaktorów, a następnie tytuł (odmiennie jest przy cytowaniu pracy Sugar z 1991) oraz konsekwentnie używanie „W:” a nie „In:” (np. przy podawaniu danych bibliograficznych pracy Złotorzycka i Modrzejewska 1988). Myślę również, że warto byłoby graficznie odróżnić sposób zapisu przywoływanej literatury od sposobu zapisu nazwiska odkrywcy gatunku, bowiem w pracy zarówno nazwiska autorów prac jak i opisujących gatunek są w nawiasach okrągłych i oddzielone przecinkiem od roku publikacji czy opisanie gatunku. Uwagę moją zwróciły drobne nieścisłości, np. na str. 8 Doktorantka pisze „W 2008 r. we Włoszech Capri i in. zbadali...” natomiast badania były prowadzone wcześniej, a w podanym roku wyniki zostały jedynie opublikowane; w cytowanej literaturze dotyczącej wszołów (str. 10) autorem prac z 1988 i 1994 r. jest Złotorzycka nie Złotowska; natomiast autorem cytowanej na str. 17 pracy są Zeman i Pecha, a nie Zemani i Pecha. Nieprecyzyjnym sformułowaniem jest określenie reakcji alergicznej

porażeniem kleszczowym (str. 15), bowiem reakcja alergiczna nie jest tożsama z porażeniem kleszczowym, które jest związane z działaniem neurotoksyny. Pewną nieścisłością jest zawarta na pierwszej stronie wstępu charakterystyka środowiska występowania kleszczy (str. 5.). Opis dotyczy głównie kleszcza pospolitego *Ixodes ricinus*, o czym warto było wspomnieć, bowiem inne gatunki jak np. kleszcz łąkowy *Dermacentor reticulatus* preferujący tereny łąkowe, mogą być liczniejsze w innych typach środowiska. Rozumiem jednak, że w pracy szczególną uwagę poświęcono *I. ricinus* jako kleszczowi o największym znaczeniu medycznym i weterynaryjnym nie tylko w Polsce, ale też w i Europie. Przeoczeniem jest nie uwzględnienie kleszczy pozagniazdowych przy wymienianiu grup ekologicznych kleszczy (str. 13). Kleszcze pozagniazdowe opisano jednak w dalszej części tekstu.

W rozdziale „Materiał i metody” warto moim zdaniem zwrócić uwagę na to, czy opisane metody izolacji DNA z wykorzystaniem komercyjnych zestawów były wykonywane zgodnie z instrukcją producenta, czy też były stosowane własne modyfikacje. Uzupełnienia wymaga też informacja co stanowiło kontrolę dodatnią i ujemną przeprowadzanych reakcji PCR. Czy otrzymane produkty poddano sekwencjonowaniu w celu potwierdzenia otrzymanego wyniku? Moim zdaniem warto również zamieścić informację o podawaniu wielkości produktu uznawanej ostatecznie za wynik dodatni, bowiem zarówno w przypadku *A. phagocytophilum* jak i *B. microti* podawano dwie wielkości. Czy produkty te były wynikami kolejnych reakcji PCR? Czy za każdym razem wykonywano elektroforezę po pierwszej i drugiej reakcji (nested) PCR? Czy wynik pierwszej reakcji wpływał na przeprowadzenie reakcji kolejnej?

Przy podawaniu wyników dotyczących infestacji (str. 35) warto podać również wartość procentową umożliwiającą porównanie własnych wyników z wynikami innych autorów. W pierwszym podrozdziale wyników Autorka podaje w tabelach (tab. 2 i 3 – str. 36) udział poszczególnych stadiów rozwojowych kleszczy *I. ricinus* i *I. hexagonus* z uwzględnieniem ekotypu występowania sarny. Te same wartości, jednak bez uwzględniania różnicowania na ekotypy, pojawiają się ponownie w tabeli 15 (str. 58). Może warto by było przy przygotowywaniu publikacji rozważyć umieszczenie tych wartości w jednej, kompleksowej tabeli.

Na str. 37, w tekście, Autorka podaje procentowy udział kleszczy infestujących poszczególne części ciała. Podane wartości odnoszą się jednak nie do wszystkich zebranych kleszczy łącznie lecz jedynie do *I. ricinus*, co Autorka wyraźnie przedstawia w tabeli 4. Pewne rozbieżności dotyczą podanego procentu ekstensywności inwazji przez kleszcze saren z ekosystemu polnego. Czy wartość ta, tak jak podano w tekście, wynosi 28,7% (str. 58) czy jak podano w tabeli (tab. 16) 30,0%? Pewien niedosyt budzi brak opisu w rozdziale „Wyniki” różnic w infestacji sarny między okresem wiosennym i zimowym oraz różnic między kolejnymi latami badań.

Szkoda, że przy badaniu występowania patogenów w kleszczach zebranych z saren z różnych ekosystemów nie przeprowadzono analizy statystycznej różnic w poziomie zakażenia między okazami żyjącymi w lesie i na polach. Nie bardzo rozumiem w jaki sposób obliczono podaną w tabeli 17 wartość ekstensywności inwazji osobników męskich sarny ekotypu leśnego i osobników żeńskich sarny ekotypu leśnego oraz w tabeli 18 wartość ekstensywności inwazji osobników męskich sarny ekotypu polnego i osobników żeńskich sarny ekotypu polnego. Również nie rozumiem w jaki sposób obliczono wartości procentowe wykrycia *A. phagocytophilum* w kleszczach zebranych z saren „leśnych” i „polnych” oraz odsetek zakażenia kleszczy z saren „polnych” pierwotniakiem *B. microti* (tab. 21), w jaki sposób obliczono odsetek równoczesnego występowania *A. phagocytophilum* w krwi i śledzionie saren (tab. 23) oraz w jaki sposób obliczono odsetek zainfekowania *B. microti* i *A. phagocytophilum* kleszczy *I. ricinus* zebranych z roślinności w poszczególnych lokalizacjach (tab. 24).

Mimo krytycznych uwag rozprawę doktorską Pani mgr Patrycji Opalińskiej oceniam wysoko. Uważam, że oceniana praca pod względem poziomu merytorycznego i wartości poznawczej zasługuje na uznanie. Z pewnością zebrane wyniki będą publikowane w czasopiśmie o wysokim poziomie, a zgromadzone dane mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych badań związanych z szeroko rozumianym krążeniem patogenów chorób transmisyjnych w środowisku.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wszystkie ustawowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim. Wobec powyższego zwracam się do Rady Wydziału Geograficzno-Biologicznego Uniwersytetu Pedagogicznego im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr Patrycji Opalińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Instytut Ekologii i Ochrony Środowiska
| Ochrony Środowiska
KIEROWNIK

* Prof. Dariusz Kłosowski