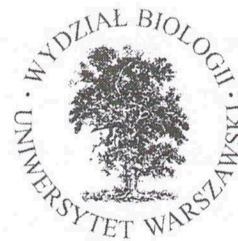




UNIwersytet  
WARSAWski

Wydział Biologii  
Instytut Biologii Funkcjonalnej i Ekologii, Zakład Parazytologii

dr hab. Renata Welc-Falęciak  
tel.: 22 55 41 031, email: r.welc-faleciak@uw.edu.pl



Warszawa, 20.07.2022

**Recenzja rozprawy doktorskiej  
mgr Adama Kamila Trzeszczkowskiego  
pod tytułem**

**„Znacznie kleszczy *Dermacentor reticulatus* i *Ixodes ricinus* w transmisji czynników  
chorobotwórczych na terenie Obszaru Chronionego Krajobrazu Doliny Bugu i Nurca”  
wykonanej w Klinice Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji  
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku pod kierunkiem  
Prof. dr hab. n. med. Sławomira Pancewicza i dr hab. n. med. Justyny Dunaj-Małyszko**

Podstawą recenzji jest pismo Dziekan Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim Prof. dr hab. Iriny Kowalskiej z dnia 27 maja 2022 r.

**Przedmiot rozprawy i jego naukowe znaczenie**

Recenzowana rozprawa doktorska Pana mgr Adama Kamila Trzeszczkowskiego przedstawia wyniki badań, których głównym celem była ocena występowania i aktywności sezonowej dwóch gatunków kleszczy, *Dermacentor reticulatus* i *Ixodes ricinus*, na terenie Obszaru Chronionego Krajobrazu Doliny Bugu i Nurca. Doktorant podjął także próbę oceny wpływu czynników biotycznych i abiotycznych na występowanie badanych gatunków kleszczy w zróżnicowanych ekosystemach oraz oszacował częstość występowania wybranych czynników chorobotwórczych (*Borrelia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia* spp., *Rickettsia* spp., *Bartonella* spp. i *Coxiella burnetii*) w populacji badanych kleszczy obu gatunków.

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa  
tel.: 22 55 41 104, faks: 22 55 41 106  
e-mail: dziekan@biol.uw.edu.pl  
<http://www.biol.uw.edu.pl>

Szybko rozprzestrzeniające się choroby zakaźne (*Emerging Infectious Diseases*), do których należą choroby odkleszczowe, stanowią niezwykle istotny problem dla zdrowia publicznego. Dotyczy to zwłaszcza obszaru północno-wschodniej Polski, chociaż ostatnie badania wskazują, że teren całego kraju stanowi region endemiczny dla chorób odkleszczowych. Borelioza z Lyme jest jedną z najczęściej diagnozowanych chorób odkleszczowych w Europie, także w Polsce. Wektorem dla krętków *Borrelia* jest kleszcz pospolity *I. ricinus*, który ma największe znaczenie epidemiologiczne i odpowiedzialny jest za przenoszenie także wielu innych patogenów, m. in. wirusa KZM, bakterii z rodzajów *Anaplasma*, *Rickettsia* czy pierwotniaków *Babesia*. Stąd też cele rozprawy są niezwykle istotne i aktualne oraz wpisują się w wiodące trendy badawcze, a rozpatrywane zagadnienia są ważne nie tylko z poznawczego punktu widzenia, lecz także mogą mieć znaczenia dla przyszłych działań praktycznych w zakresie ochrony zdrowia.

### **Formalny opis rozprawy**

Recenzowana rozprawa posiada układ typowy dla rozpraw doktorskich, liczy ogółem 151 stron, zawiera 11 rozdziałów, w tym m. in. wstęp, cele rozprawy, wyniki, dyskusja, jasno sformułowane wnioski końcowe, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz obszerny spis literatury zawierający 205 pozycji. Ponadto praca zaopatrzona jest w spisy rycin i tabel. Ryciny, fotografie i tabele umieszczone są w tekście, co ułatwia czytanie rozprawy. W tekście rozprawy niestety występują liczne błędy edytorskie (brak kursywy dla nazw łacińskich [str. 12, 104], *Apodemus agravius* zamiast *Apodemus agrarius* [str.11], ‘atopowe zapalenie płuc’ zamiast ‘atypowe zapalenia płuc’ [str. 29], ‘długość zalegania pokrywy śnieżnej’ wyrażonej w dniach zamiast ‘czas zalegania pokrywy śnieżnej’ [str. 33], podwójne kropki, brak kropek, brak nawiasu, brak spacji między słowami itp. [m. in. str. 13, 14, 26, 28, 30, 33, 87, 89] oraz niejasne sformułowania („kleszcz, który został zakażony podczas procesu przeobrażania” [str. 25]), które utrudniają czytanie pracy. Sugeruję, aby pozostawić termin ‘imago’ dla owadów, a w przypadku pajęczaków stosować określenie ‘postać dorosła’ lub ‘samiec’/’samica’ [str. 30]. Dla rycin nr 41 i 44 zabrakło w opisie jednostek, w których wyrażono długość dnia. W tekście rozprawy Doktorant często odnosi się do opublikowanych wyników cytując prace przeglądowe zamiast oryginalnych prac badawczych, w których wyniki te pierwotnie opisano.



## Ocena merytoryczna

**Wstęp** rozprawy jest dość obszerny (25 stron), napisany w sposób usystematyzowany, stanowi jasne i rzeczowe wprowadzenie do zaplanowanych badań i uzasadnia ich celowość. W pierwszej części Autor omawia występowanie, morfologię i cykle życiowe kleszczy *D. reticulatus* i *I. ricinus*, w drugiej charakteryzuje wybrane patogeny przenoszone przez oba gatunki kleszczy. Autor zwrócił uwagę na preferencje siedliskowe obu gatunków kleszczy oraz wpływ czynników abiotycznych na aktywność i rozmieszczenie pionowe tych pajęczaków. Wstęp rozprawy został wzbogacony o zdjęcia wybranych stadiów rozwojowych obu gatunków kleszczy, które zostały wykonane przez Autora. Moje wątpliwości budzi kilka stwierdzeń zawartych we wstępie rozprawy. W tabeli 2 Doktorant wymienił gatunki (a nie rodzaje, tak jak jest to napisane w tytule tabeli [str. 23]) patogenów przenoszonych przez kleszcze *D. reticulatus*, wśród których nie zawarł gatunku *Rickettsia raoulti*. Infekcje *R. raoulti* z wysoką ekstensywnością, sięgającą nawet 50%, wielokrotnie opisywano w populacji kleszczy *D. reticulatus*, także w Polsce (m. in. Chmielewski i wsp. 2009 *Emerg Infect Dis* 15(3): 486–488, Wójcik-Fatla i wsp. 2013 *Ann Agric Environ Med.* 20(2):276-9, Mierzejewska i wsp. 2015 *Parasites & Vectors* 8:490). Jednocześnie Doktorant w tabeli umieścił krętki *B. burgdorferi* jako patogeny przenoszone przez kleszcze *D. reticulatus* oraz pierwotniaki *Toxoplasma gondii* jako patogeny przenoszone przez kleszcze *I. ricinus*. W opublikowanych dotychczas pracach potwierdzono obecność materiału genetycznego obu gatunków patogenów u wspomnianych gatunków kleszczy (np. Dunaj i wsp. 2021 *Adv Med Sci* 66(1):113-118, Pawełczyk i wsp. 2021 *Parasites & Vectors* 14(1):348. Sroka i wsp. 2003 *Ann Agric Environ Med.* 10:121-123). Nie udowodniono jednak jednoznacznie, że kleszcze te są zdolne do transmisji krętków *B. burgdorferi* lub pierwotników *T. gondii* do wrażliwych na zakażenie/zarażenie żywicieli w warunkach naturalnych. W podrozdziale 2.4. Doktorant stwierdził, że „głównym wektorem *Babesia microti* na kontynencie europejskim jest *Ixodes trianguliceps*, żerujący głównie na gryzoniach, a w przypadku *Babesia divergens* jest to *I. ricinus*”. Dostępne dane wskazują, że *I. trianguliceps* odgrywa istotną rolę w transmisji *B. microti* w środowisku na terenie Europy Zachodniej, podczas gdy w Europie Centralnej i Wschodniej wydaje się, że to *I. ricinus* jest głównym wektorem dla tych pierwotniaków. Dodatkowo *I. trianguliceps* jedynie sporadycznie atakuje ludzi, zatem jego wpływ na liczbę zachorowań wywołanych inwazją tego pierwotniaka jest znikomy. W Polsce ekstensywność zarażenia *B. microti* u kleszczy *I. ricinus* waha się w granicach 2-16% i jest kilkakrotnie wyższa niż w przypadku *B. divergens* (0,3-2%).

**Cele pracy** zostały sformułowane w sposób logiczny i spójny. W rozdziale poświęconym **metodyce badań** Doktorant szczegółowo scharakteryzował tereny zbioru kleszczy z uwzględnieniem lokalnej flory i fauny, a opisy zostały wzbogacone o zdjęcia badanych transektów. W opisie stosowanych metod biologii molekularnej w zakresie identyfikacji wybranych patogenów odkleszczowych zabrakło informacji dotyczących sekwencji nukleotydowych stosowanych starterów (*Babesia* spp.) oraz warunków PCR. Czy specyficzne dla *Babesia* startery zostały zaprojektowane przez Autora rozprawy? Jeśli tak, brakuje informacji na ten temat. Przy opisie metod molekularnych stosowanych z wykorzystaniem dostępnych komercyjnie zestawów do identyfikacji wybranych patogenów podałabym ich czułość i specyficzność gatunkową w wykrywaniu badanych mikroorganizmów. Brakuje także opisu testów statystycznych stosowanych do analizy zmienności występowania kleszczy w zależności od czynników środowiskowych tj. temperatura, wilgotność i długość dnia.

**Wyniki** zostały przedstawione dość obszernie na 60 stronach zawierających prawie 40 tabel i 32 ryciny. W trakcie trzech lat badań (2016-2018) Autor zebrał 811 kleszczy, z czego większość (65%) stanowiły osobniki kleszcza łąkowego. Doktorant wykazał, że kleszcze *I. ricinus* preferują głównie leśne obszary zacienione oraz obszary na granicy łąki i lasu w przeciwieństwie do kleszczy *D. reticulatus*, które najczęściej zbierano z terenów łąk, pastwisk oraz obszarów w pobliżu rzeki. Badane gatunki kleszczy wykazywały także odmienną aktywność sezonową. Podczas gdy szczyt aktywności kleszczy *I. ricinus* przypadał na maj oraz przełom sierpnia i września, to kleszcze łąkowe zbierane były najczęściej w kwietniu i październiku. Stadium dominującym u obu gatunków kleszczy były osobniki dorosłe, nimfy stanowiły mniej niż 10% zbieranych osobników. Na uwagę zasługuje szczegółowy opis występowania zebranych stadiów rozwojowych obu gatunków kleszczy na wybranych obszarach w czasie trzyletnich badań. Dlatego pewnym zaskoczeniem jest brak analizy statystycznej uzyskanych danych, która niewątpliwie podniosłoby wartość przedstawionych wyników i wskazałaby istotne zależności w aktywności tych pajęczaków.

Zagęszczenie kleszczy zmieniało się w czasie w zależności od temperatury i wilgotności. Kleszcze *D. reticulatus* wykazywały większą aktywność w niższej temperaturze (średnio ok 18 °C) przy średniej wilgotności 71%, natomiast kleszcze *I. ricinus* preferowały wyższą temperaturę (21 °C) przy niższej wilgotności (67%). Doktorant analizował także zmiany w aktywności obu gatunków kleszczy w zależności od długości dnia posługując się terminami 'długi', 'krótki' dzień oraz 'dni o średniej długości trwania'. Tego typu określenia powinny zostać doprecyzowane poprzez podanie zakresu liczby godzin dla każdego terminu w części Metodyka badań. Bez tej wiedzy, jedynie na



podstawie średnich, trudno zinterpretować przedstawione wyniki. W mojej opinii część danych niepotrzebnie została przedstawiona na dwa różne sposoby tj. za pomocą tabeli i rycin prezentujących te same wartości (np. tabela 8 i ryciny 18 i 19, tabele 15, 16, 17 i ryciny 26, 27, 28), co niepotrzebnie zwiększa objętość rozprawy. Chciałabym prosić Doktoranta o wyjaśnienie dwóch kwestii dotyczących części terenowej rozprawy:

1. Dlaczego w zebranych materiale nie pojawiają się larwy – czy jest to zabieg celowy (nie były zbierane, pomimo obecności) czy też nie udało się ich zebrać metodą flagowania?
2. Koszenie jest uważane za jedną z metod ograniczenia liczebności kleszczy w środowisku. Jeden z badanych obszarów (Obszar II, łąka) był, według opisu w rozdziale Metodyka badań, regularnie koszony. Czy tego typu praktyki miały wpływ na aktywność kleszczy i ich liczebność na tym obszarze?

Wyniki uzyskane w części laboratoryjnej rozprawy wskazują, że kleszcze *I. ricinus* na terenie Obszaru Chronionego Krajobrazu Doliny Bugu i Nurca stanowią istotny wektor dla krętków *Borrelia* (ekstensywność zakażenia 34%), natomiast *D. reticulatus* – dla pierwotniaków z rodzaju *Babesia* (11%). Ciekawe wyniki dotyczą zmian w poziomie ekstensywności zakażenia kleszczy w trakcie trzech lat badań. O ile w przypadku *D. reticulatus* Autor obserwował w tym czasie ponad dwukrotny wzrost odsetka zakażonych osobników (z 29% do ponad 65%), to u kleszczy *I. ricinus* odnotował odwrotną zależność – spadek liczby zakażonych osobników z 70% do 34%. Gatunkiem dominującym dla rodzaju *Borrelia* był *B. afzelii*. Doktorant potwierdził także obecność *B. miyamotoi* u kleszczy *I. ricinus*, stosunkowo niedawno opisanego gatunku odpowiedzialnego za gorączki powrotne u ludzi. Do tej części rozprawy nasuwa mi się kilka pytań, o wyjaśnienie których chciałabym zapytać Doktoranta:

- Ekstensywność zakażenia *Rickettsia* u kleszczy *I. ricinus* i *D. reticulatus* w Polsce waha się w granicach 10-50% (Kubiak i wsp. 2022 *Pathogens* 11(5):542, Dwużnik-Szarek i wsp. 2022 *Sci Rep* 12(1):5755, badania własne). Niektórzy autorzy sugerują, że bakterie z rodzaju *Rickettsia* stanowią u kleszczy grupę endosymbiontów mających wpływ m. in. na ruchliwość tych pajęczaków (Kagemann i Clay 2013 *J Med Entomol* 50, 155–162). Jaka może być przyczyna nie wykrycia DNA *Rickettsia* u badanych kleszczy?

- W tabeli nr 30 (str. 95) suma kleszczy zakażonych *Borrelia* wynosi 121, natomiast w podrozdziale 2.2 w zestawieniu genogatunków krętków *Borrelia* ujęto 131 izolatów. Skąd wynika ta różnica? Biorąc pod uwagę, że w wyniku sekwencjonowania ampikonów *Borrelia* potwierdzono obecność m. in. gatunku *B. miyamotoi*, używanie terminu *B. burgdorferi* dla wszystkich uzyskanych izolatów jest nieuzasadnione. Sugerowałabym także zdeponowanie uzyskanych sekwencji nukleotydowych w bazie GenBank NCBI, co pozwoli na dostęp do uzyskanych wyników wszystkim zainteresowanym tematyką patogenów odkleszczowych.
- Istotnym problemem w epidemiologii chorób odkleszczowych są koinfekcje, czyli jednoczesne, wielogatunkowe zakażenia, szczególnie trudne do zdiagnozowania u ludzi. Koinfekcje u kleszczy są wynikiem m. in. ich żerowania na zwierzętach, które są żywicielami dla kilku różnych gatunków patogenów oraz możliwej transmisji transstadialnej i transowarialnej u kleszczy. W rozprawie Autor przedstawił dane dotyczące koinfekcji ograniczając je jedynie do nazw rodzajowych patogenów biorących udział w zakażeniach wielogatunkowych. Czy na podstawie wyników genotypowania patogennych izolatów możliwe jest określenie sposobu ich 'nabycia' przez kleszcze poprzez wskazanie potencjalnego żywiciela/ żywicieli, na których kleszcze te żerowały?
- Genotypowanie uzyskanych izolatów *Babesia* i *Borrelia* zostało przeprowadzone w oparciu o sekwencjonowanie i analizę uzyskanych sekwencji nukleotydowych w programie BLAST National Center for Biotechnology Information. Jakiej długości fragmenty DNA analizowano? Jaki fragment genu *Borrelia* sekwencjonowano? Jaki otrzymano stopień podobieństwa badanych sekwencji do sekwencji zdeponowanych w bazie GenBank?
- Obecność w Polsce gatunku *Borrelia yangtzensis*, który dotychczas opisywano jedynie w Azji, jest dość zaskakująca. W jaki sposób można wytłumaczyć obecność tego gatunku w Polsce?

**Dyskusja** uzyskanych wyników z uwzględnieniem najnowszych osiągnięć w temacie jest wyczerpująca (liczy 14 stron) i dobrze poprowadzona. Mgr Adam Trzeszczkowski krytycznie odnosi swoje wyniki do dostępnych publikacji, zarówno krajowych, jak i międzynarodowych. Postawione w rozprawie cele zostały w pełni osiągnięte. Autor w dyskusji, na podstawie uzyskanych wyników,

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa  
 tel.: 22 55 41 104, faks: 22 55 41 106  
 e-mail: dziekan@biol.uw.edu.pl  
 http://www.biol.uw.edu.pl



dokonał założenia, że rezerwuarem *Borrelia spielmanii* mogą być inne gatunki zwierząt poza zołędnicą europejską. Rolę rezerwuaru zoonotycznego dla *B. spielmanii* prawdopodobnie pełnią także jeże (Jahfari i wsp. 2017 *Parasites & Vectors* 10(1):134) i gryzonie z rodzajów *Apodemus* i *Rattus* (Richter i wsp. 2011 *Appl Environ Microbiol.* 77(11):3565-70), o czym warto byłoby wspomnieć w rozprawie. Wnioski są jasno sformułowane i nie budzą zastrzeżeń. Spis literatury obejmuje 205 pozycji ułożonych w kolejności alfabetycznej. Warto dodać, że Doktorant jest współautorem jednej publikacji, która ukazała się w 2021 r. w *Advances in Medical Sciences*. Niezależnie od powyższych uwag, wysoko oceniam jakość rozprawy doktorskiej mgr Adama Trzeszczkowskiego. Otrzymane wyniki są niewątpliwie danymi wartościowymi i poszerzają naszą wiedzę o czynnikach wpływających na aktywność kleszczy *I. ricinus* i *D. reticulatus* oraz ich roli w transmisji patogennych mikroorganizmów.

### Wniosek końcowy

Podsumowując stwierdzam, iż przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Adama Trzeszczkowskiego pod tytułem „Znaczenie kleszczy *Dermacentor reticulatus* i *Ixodes ricinus* w transmisji czynników chorobotwórczych na terenie Obszaru Chronionego Krajobrazu Doliny Bugu i Nurca” stanowi istotny wkład w poszerzenie wiedzy o roli kleszczy jako wektorów patogennych mikroorganizmów i czynników wpływających na zmiany zagęszczenia tych pajęczaków w środowisku. Praca doktorska spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim w myśl art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) oraz art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U z 2018 r. z poz. 1669 z późn. zm.). W związku z tym wnoszę do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Adama Trzeszczkowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

