

Prof. dr hab. Aleksander W. Demiaszkiewicz
Pracownia Parazytoz Zwierząt Dzikich
Instytut Parazytologii im. W. Stefańskiego PAN

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Niny Król pt. "Epizootiologiczna rola kleszczy, pasożytów psów i kotów, w Aglomeracji Wrocławskiej"

Kleszcze właściwe z rodziny Ixodidae należą do najgroźniejszych pasożytów zewnętrznych zwierząt i ludzi. Powoduje to fakt, że pełnią one rolę wektorów wielu chorób, określanych jako choroby odkleszczowe, wywoływanych przez chorobotwórcze mikroorganizmy. Kleszcze mogą być rezerwuarem i przenosicielem zarówno wirusów, bakterii jak i pierwotniaków. Niektóre z tych patogenów stanowią zagrożenie zarówno dla zwierząt jak i ludzi. Dlatego choroby przenoszone przez kleszcze odgrywają tak ważną rolę zarówno w medycynie weterynaryjnej jak i w dziedzinie ochrony zdrowia publicznego. Przedmiotem ocenianej rozprawy są badania nad bakteriami i pasożytniczymi pierwotniakami z trzech wektorowych gatunków kleszczy: *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* i *Ixodes hexagonus* pasożytujących na psach i kotach w Aglomeracji Wrocławskiej. Pierwszy z nich, kleszcz pospolity *I. ricinus* stanowi największe zagrożenie dla ludzi, będąc głównym przenosicielem boreliozy, drugi, kleszcz łąkowy jest odpowiedzialny głównie za przekazywanie babeszjozy psów, natomiast trzeci z gatunków, kleszcz jeżowy *I. hexagonus* odgrywa mniejsze znaczenie jako wektor.

Jakkolwiek badania nad zakażeniem kleszczy patogenami prowadzono już w kilku krajowych ośrodkach badawczych, były to w większości przypadków badania przyczynkowe, ograniczające się do rejestracji pojedynczych gatunków. Dlatego też z uznaniem należy przyjąć wybór tematu rozprawy doktorskiej i

podjęcie przez mgr Ninę Król szerokich badań nad rolą kleszczy w przenoszeniu bakterii i pierwotniaków na psy i koty w Aglomeracji Wrocławskiej. Są to nieliczne w skali światowej i pierwsze w Polsce kompleksowe badania nad tym zagadnieniem, dotyczące ściśle określonego terenu aglomeracji miejskiej. Wyniki tych badań są cennym uzupełnieniem luk istniejących w dotychczasowej wiedzy dotyczącej epizootiologicznej roli kleszczy w rozprzestrzenieniu badanych patogenów.

Recenzowana rozprawa została przygotowana bardzo starannie, posiada układ typowy dla rozpraw doktorskich, liczy ogółem 114 stron, zawiera 6 rozdziałów, streszczenia w języku polskim i angielskim, obszerny spis literatury. Ponadto praca zaopatrzona jest w spisy tabel, rycin i fotografii oraz wykaz załączników. Ryciny, fotografie i tabele umieszczone są we właściwych miejscach w tekście, co ułatwia czytanie rozprawy.

Pracę otwiera obszerny „Wstęp” liczący 24 strony, w którym Autorka wykorzystując bogate piśmiennictwo omówiła systematykę, biologię, ekologię i specyfikę żywicielską kleszczy, przedstawiła gatunki kleszczy będących pasożytami psów i kotów w Polsce oraz transmitowane przez nie patogeny. Następnie szczegółowo scharakteryzowała trzy gatunki kleszczy: *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* i *Ixodes hexagonus*, będące przedmiotem badań rozprawy oraz stwierdzone w nich patogeny i powodowane przez nie choroby. Ostatnia część wstępu poświęcona jest lokalizacji kleszczy w miastach za pomocą geograficznych systemów informacyjnych (GIS).

W drugim, jednostronicowym rozdziale Autorka sformułowała cele pracy. Celem przeprowadzonych badań była ocena roli psów i kotów w podtrzymywaniu krążenia kleszczy i przenoszonych przez nie krętków *Borrelia* spp. w zróżnicowanym antropogenicznie środowisku określonym przy wykorzystaniu narzędzi geograficznego systemu informacyjnego (GIS), oraz określenie poziomu zakażenia kleszczy pasożytujących na psach i kotach

patogenami: *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia* spp., *Candidatus N. mikurensis* oraz *Rickettsia* spp. w Aglomeracji Wrocławskiej.

Istotnym celem rozprawy były także analiza świadomości zagrożeń chorobami odkleszczowymi u właścicieli badanych psów i kotów. W świetle przedstawionych we wstępie danych podjęcie tych badań było w pełni uzasadnione. Na uznanie zasługuje szeroki zakres planowanych badań i ich kompleksowy charakter.

Trzeci rozdział „Materiał i metody” obejmuje 12 stron. W rozdziale tym Autorka opisuje teren badań oraz omawia pochodzenie materiału badawczego w postaci okazów kleszczy oraz metod ich pozyskiwania. Łącznie pozyskano 1555 okazów kleszczy pochodzących z 760 psów i 171 kotów a także 531 kleszczy zebranych z roślinności. Jest to bardzo bogaty materiał badawczy, pozwalający na wykonanie szerokich badań. Badania epizootiologiczne uzupełniono informacjami pochodzącymi z 732 ankiet wypełnionych dobrowolnie przez właścicieli psów i kotów. Analizowanym materiałem były także 173 próby krwi psów wrocławskich, które zbadano w kierunku wykrycia pierwotniaków *Babesia* spp. W pracy wykorzystano także dane Laboratorium Weterynaryjnego VETLAB we Wrocławiu dotyczące wykrywania *Babesia* spp. we krwi psów. W celu określenia środowiskowego zróżnicowania uwarunkowania występowania kleszczy jako pasożytów psów i kotów wykorzystano metody geograficznego systemu informacji (GIS). W rozdziale Autorka również szczegółowo omówiła metody molekularne: PCR, real-time PCR i nested PCR wykorzystane do wykrywania poszczególnych patogenów przenoszonych przez kleszcze, a także użyte metody analizy statystycznej i opisowej. Dobór metod zastosowanych w ocenianej pracy jest właściwy i nie budzi zastrzeżeń.

Zasadniczą część rozprawy stanowi rozdział czwarty “Wyniki” o objętości 17 stron. Autorka stwierdziła, że gatunkiem dominującym wśród zebranych kleszczy był *I. ricinus* (87,4%), rzadziej występowały *I. hexagonus* (9,4%) i *D. reticulatus* (3,2%). U kleszczy pospolitych najczęściej zbieranym

stadium rozwojowym były samice (91,2%), następnie samce (8,1%) oraz nimfy (0,7%). U kleszczy łąkowych zebrano tylko osobniki dorosłe, samice były dominującym stadium (67,4%), a samce były mniej liczne (32,6%). Wśród kleszczy jeżowych najliczniejsze były nimfy (71,5%), mniej liczne samice (23,4%), a najrzadziej stwierdzano larwy (5,1%). Nie zebrano samców należących do tego gatunku. Ustalono najczęstsze miejsca wkłucia kleszczy u psów i kotów. Była to okolica głowy u 67,2% zwierząt, tułów u 20,3%, kończyny i pachwiny u 16,4% oraz ogon u 2,3%. Zbadano aktywność sezonową kleszczy zebranych z psów i kotów, która różniła się u poszczególnych gatunków. Nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie w opadnięciu psów i kotów oraz pomiędzy zwierzętami spacerującymi w terenach różniących się stopniem antropopresji. Metodami molekularnymi Autorka ustaliła, że kleszcze pospolite *I. ricinus* były zakażone krętkami *Borrelia* spp. w większym stopniu (21,7%) niż kleszcze jeżowe *I. hexagonus* (1,5%). Kleszcze łąkowe *D. reticulatus* okazały się nie zakażone. Sekwencjonowanie pozytywnych prób kleszczy pospolitych i jeżowych wykazało obecność trzech genogatunków *Borrelia* spp. U kleszczy pospolitych najczęściej wykrywano krętka *B. afzelii*, następnie *B. miyamotoi*, a najrzadziej *B. garinii*. W kleszczach jeżowych wykryto tylko DNA *B. afzelii*. Nie stwierdzono istotnych różnic w zakażeniu kleszczy zebranych ze zwierząt spacerujących po terenach wysokiej i niskiej antropopresji. Spośród pozostałych badanych patogenów najczęściej wykrywana była *Rickettsia* spp., którą stwierdzono u 30,6% badanych kleszczy. Najwyższy poziom infekcji stwierdzono u kleszczy łąkowych *D. reticulatus* (60,9%), następnie u kleszczy pospolitych *I. ricinus* (50,4%), a najniższy u kleszczy jeżowych *I. hexagonus* (2,2%). U kleszczy łąkowych wykazano obecność *R. raoultii* we wszystkich badanych próbach. U kleszczy pospolitych dominowała (80%) *R. helvetica*, a 20% stanowiła *R. monacensis*. Występowanie *A. phagocytophilum* zostało potwierdzone u 14,4% kleszczy z rodzaju *Ixodes*. Kleszcze *I. ricinus* były częściej zakażone tym patogenem (21,3%) niż *I.*

hexagonus (8,1%). *Candidatus* N. mikurensis była wykryta u 4,2% przedstawicieli rodzaju *Ixodes*, a *I. ricinus* były zakażone w większym stopniu (8,1%) niż *I. hexagonus* (0,7%). Obecność *Babesia* spp. była najniższa spośród badanych patogenów, występowała u 3,6% wszystkich badanych kleszczy, jednak tylko kleszcze *I. ricinus* były zakażone (9,0%). Dominującym gatunkiem była *B. microti* (prawie 90%), a *B. venatorum* stanowiła prawie 10% sekwencjonowanych prób.

W rozdziale piątym „Dyskusja” liczącym 10 stron Autorka w sposób dojrzały i zrównoważony porównała i przedyskutowała swoje wyniki z danymi pochodzącymi z publikacji innych badaczy.

W rozdziale szóstym „Podsumowanie i wnioski” Autorka sformułowała najważniejsze stwierdzenia i wnioski logicznie wypływające z treści rozprawy, jeszcze raz podkreślając jej wartość. Kolejne rozdziały to „Podziękowania” i obszerny spis literatury przedmiotu obejmujący 245 publikacji. Wykorzystanie tak licznych pozycji piśmiennictwa dowodzi, że Autorka bardzo dobrze opanowała teoretyczne podstawy zagadnienia.

Do najważniejszych wyników rozprawy należy stwierdzenie, że psy i koty na terenach miejskich pełnią rolę żywicieli zarówno kleszcza pospolitego *I. ricinus*, jak również kleszcza jeżowego *I. hexagonus* i kleszcza łąkowego *D. reticulatus*, a ryzyko infestacji przez kleszcze występuje nie tylko w terenach „półnaturalnych” jak parki, ale również antropogenicznych, jak skwery i trawniki. Brak naturalnych ekosystemów nie stanowi bariery w ekspansji kleszczy i rozprzestrzenianiu się chorób odkleszczowych.

Istotne jest również ustalenie, że wysoki poziom infekcji kleszczy *I. ricinus* zebranych z roślinności oraz z psów i kotów krętkami *Borrelia* spp. sugeruje, że zwierzęta domowe mogą przyczyniać się do podtrzymywania krążenia tych patogenów, czynników etiologicznych boreliozy. Brak różnic w poziomie zakażenia *I. ricinus* zebranych ze zwierząt spacerujących po terenach o zróżnicowanej antropopresji świadczy o wysokim ryzyku epidemiologicznym.

Wykrycie *Borrelia* spp. również u kleszczy *I. hexagonus* i *D. reticulatus* potwierdza rolę tych kleszczy w cyklu krążenia krętków.

Doniosłym osiągnięciem było wykazanie u kleszczy *I. ricinus* zebranych z psów i kotów wysokiej prewalencji pozostałych patogenów: bakterii *A. phagocytophilum*, *Candidatus N. mikurensis*, *R. helvetica* i *R. monacensis* oraz pierwotniaków *B. microti* i *B. venatorum*, która świadczy o istotnej roli tych kleszczy w kształtowaniu sytuacji epizootycznej w Aglomeracji Wrocławskiej.

Bardzo ważna jest także detekcja chorobotwórczych mikroorganizmów (za wyjątkiem *Babesia* spp.) również u kleszczy *I. hexagonus*, co wskazuje na udział tych stawonogów w rozprzestrzenianiu chorób odkleszczowych.

Ciekawym spostrzeżeniem jest stwierdzenie 9% prewalencji *B. canis* w rozmazach krwi psów, równocześnie z niewykryciem tego pierwotniaka u kleszczy *D. reticulatus*, co świadczy o stabilizującym się dopiero układzie pies - *B. canis* – *D. reticulatus* na terenie Aglomeracji Wrocławskiej.

Wyniki te mają ważny aspekt praktyczny w epidemiologii i profilaktyce chorób przenoszonych przez kleszcze u ludzi i zwierząt.

Chciałbym także wspomnieć o kilku drobnych uwagach, które nasunęły się podczas lektury tej pracy.

Na str. 6. - ostatni akapit o dirofilariozie nie dotyczy biologii i ekologii kleszczy.

Na str. 9. – wiersz 1 od góry - niepoprawne określenie „trzyżywicielski”, zgodnie ze „Słownikiem poprawnej polszczyzny PWN” powinno być „trójżywicielski”.

Na str. 14. – wiersz 12 od dołu – brak pełnej łacińskiej nazwy gatunkowej żubra *Bison bonasus*.

Na str. 20. – wiersz 13 od góry- błędnie napisane nazwisko, powinno być Rożej-Bielicka.

Na str. 22. – wiersz 10 od góry – „zgony i zejścia” to przecież synonimy.

Na str. 43 – na Ryc. 3 błędnie opisany wykres. *I. ricinus* stanowią 87,4% zebranych kleszczy, a *D. reticulatus* 3,2% , a nie odwrotnie.

Te nieliczne uwagi nie umniejszają w niczym dużej wartości recenzowanej pracy.

Pod względem formalnym rozprawa mgr Niny Król nie budzi zastrzeżeń. Należy uznać za w pełni prawidłowe zarówno układ treści, wyciągnięcie wniosków w oparciu o przedstawioną dokumentację, a także wykorzystanie źródeł. Należy podkreślić, że oceniana rozprawa napisana jest jasno i przejrzysto, dobrym językiem.

Rozprawę Doktorantka opracowała sumiennie i wnikliwie w oparciu o prawidłową metodykę badań. Należy uznać, że wytyczone cele pracy zostały osiągnięte w stopniu w pełni zadowalającym.

Recenzowana dysertacja wykazując staranność wykonanych badań, samodzielność obserwacji i wnioskowania, a zatem pełne przygotowanie i dojrzałość jej Autorki do prowadzenia prac naukowych, pod każdym względem odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim.

Dlatego też z pełnym przekonaniem przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego wniosek o dopuszczenie mgr Niny Król do dalszych, przewidzianych ustawą etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę nowatorstwo opiniowanych badań, doskonałe opracowanie rozprawy, wagę naukową jak również aspekt praktyczny uzyskanych wyników, proponuję wyróżnienie tej rozprawy i przyznanie mgr Ninie Król nagrody.

Warszawa, 16.09.2016 r.



Prof. dr hab. Aleksander W. Demiaszkiewicz