



dr hab. Dorota Kiewra, prof. UWr

Wrocław, 05.06.2024 r.

## RECENZJA

**rozprawy doktorskiej Pani mgr Justyny Liberskiej  
pt. „Współwystępowanie *Babesia* spp. (Apicomplexa: Piroplasmida)  
i *Borrelia* spp. (Bacteria: Spirochaetes) w kleszczach pospolitych, *Ixodes ricinus*,  
na terenach zurbanizowanych na przykładzie Poznania”**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Justyny Liberskiej została wykonana pod kierunkiem dwóch promotorów: Pani prof. UAM dr hab. Mirosławy Dabert z Laboratorium Techniki Biologii Molekularnej oraz Pana prof. UAM dr. hab. Jerzego Michalika z Zakładu Morfologii Zwierząt na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Podjęta przez Doktorantkę tematyka badawcza jest niezwykle istotna w aspekcie notowanego w ostatnich dekadach wzrostu liczby zachorowań na choroby odkleszczowe, co jest związane głównie ze zmianami środowiskowymi, socjoekonomicznymi, większą świadomością dotyczącą odkleszczowych zagrożeń, a także lepszą diagnostyką. Wybór przez Doktorantkę terenów zurbanizowanych jako obszaru badań jest wysoce zasadny z uwagi na fakt, że ekosystemy miejskie coraz częściej są wymieniane jako ważne obszary potencjalnego kontaktu człowieka z kleszczami i patogenami, dla których kleszcze są wektorami.

Praca doktorska Pani mgr Justyny Liberskiej została przygotowana w oparciu o trzy prace, w tym dwa artykuły opublikowane w latach 2021-2023 w czasopiśmie *Tick and Tick-borne Diseases* oraz w oparciu o manuskrypt przygotowany do wysłania do czasopisma *Pathogens*. Wszystkie wchodzące w skład rozprawy prace są współautorskie i liczą od 3 do 9 autorów. Warto podkreślić, że czasopismo *Tick and Tick-borne Diseases*, w którym ukazały się obie opublikowane prace, jest anglojęzycznym, międzynarodowym, indeksowanym czasopiśmie naukowym z tzw. listy filadelfijskiej (o współczynniku wpływu *Impact Factor* 3,817). Co więcej, jest to specjalistyczne czasopismo, którego wiodąca tematyka dotyczy biologii i ekologii kleszczy, ich wektorowej roli, a także ekoepidemiologii chorób odkleszczowych ludzi i zwierząt. Opublikowanie artykułów w tak prestiżowym czasopiśmie jest niewątpliwie gwarancją, że prace prezentują wysoki poziom naukowy i wpisują się w najnowsze trendy w zakresie badań akarologicznych. Czuję się zatem zwolniona z obowiązku ponownej oceny merytorycznej obydwóch opublikowanych prac, bowiem przed przyjęciem do druku były one poddane wnikliwej recehzi przez uznanych ekspertów.

Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że we wszystkich pracach Pani mgr Justyna Liberska jest pierwszym autorem, a jej udział w przygotowanie prac oszacowany został na 60% - 70%, co jest potwierdzone w złożonych przez współautorów oświadczeniach załączonych do przedstawionej do recenzji pracy. W przypadku pracy oznaczonej jako A.1 nieco zastanawiający jest dość niski i jednakowy, bo oszacowany jedynie na 5%, udział wszystkich pozostałych ośmiu autorów pracy. Niemniej jednak uważam, że Doktorantka miała bezsprzecznie wiodący udział w powstaniu wszystkich prac. Jej udział obejmował uczestnictwo w pozyskiwaniu materiału badawczego, założenie i prowadzenie bazy danych, przeprowadzenie identyfikacji kleszczy zarówno z wykorzystaniem kluczy (okazy dorosłe), jak i metod molekularnych (stadia młodociane), testowanie i dostosowanie warunków





molekularnej detekcji *Babesia* spp. i *Borrelia* spp., a także interpretację wyników i przygotowanie manuskryptu.

Oceniana praca doktorska została przedstawiona w postaci oprawionego, estetycznie przygotowanego wydruku komputerowego. Została napisana starannie, poprawnym językiem, cechuje się przejrzystym układem. Rozprawa liczy 113 stron, zawiera czytelny spis treści, streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy. Kolejne części obejmują rozdziały zatytułowane „Wprowadzenie i główne cele rozprawy doktorskiej” oraz „Rezultaty i wnioski rozprawy doktorskiej” z podrozdziałami, a także w dalszej kolejności, rozdziały zawierające spis bibliografii, pełny tekst wszystkich wchodzących w skład przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej publikacji, oświadczenia autorów o wkładzie w powstanie artykułów oraz materiały dodatkowe w postaci tabel.

Wiodącym celem przedstawionej do oceny rozprawy była analiza poziomu zakażeń kleszczy pospolitych *Ixodes ricinus* odłowionych z roślinności oraz zebranych z psów i kotów na terenach zurbanizowanych Poznania bakteriami *Borrelia* spp. i pierwotniakami *Babesia* spp. z uwzględnieniem ich zoonotycznego potencjału i koinfekcji.

W rozdziale zatytułowanym „**Wprowadzenie i główne cele rozprawy doktorskiej**” Doktorantka zwróciła uwagę na istotne znaczenie medyczne patogenów odzwierzęcych, w tym patogenów przenoszonych przez kleszcze. Podkreśliła jednocześnie znaczenie zoonoz we współczesnym świecie i specyficzny wpływ ekosystemów miejskich na układ żywiciel-kleszcz-patogen. Omówiła znaczenie kleszczy pospolitych *I. ricinus* w aspekcie transmisji krętków boreliozy i krętków z grupy gorączek powrotnych, a także pierwotniaków z rodzaju *Babesia*. W rozdziale tym Autorka wyróżniła również cele badawcze rozprawy. Myślę jednak, że w założonych celach badawczych, a także w tytule przedłożonej do oceny rozprawy, należałoby podkreślić, że częstość występowania oraz współwystępowania *Borrelia* spp. i *Babesia* spp. szacowano zarówno dla kleszczy odłowionych z roślinności, jak i dla kleszczy zebranych ze zwierząt towarzyszących. W przedstawionych celach rozprawy warto byłoby też uwzględnić ocenę potencjału zoonotycznego wykrytych mikroorganizmów w oparciu o analizę sekwencji. Uwzględnienie jako celu badawczego porównania poziomu zakażenia patogenami kleszczy poszukujących żywicieli i kleszczy pasożytujących na psach i kotach oraz szacowanie potencjału chorobotwórczego wykrywanych drobnoustrojów podkreśla kompleksowość przeprowadzonych badań i stanowi istotną wartość recenzowanej rozprawy. Podjęcie przez Doktorantkę wieloaspektowych badań jest szczególnie istotne, bowiem przyczynia się do pełniejszego poznania interakcji kleszcz-patogen-żywiciel na terenach zurbanizowanych. O zróżnicowanym pochodzeniu objętych badaniami kleszczy świadczy dopiero opis materiału zawarty w dalszej części rozdziału, kolejnych rozdziałach oraz pracach A.2 i M.1 załączonych do rozprawy. Warto podkreślić, że badania obejmowały imponującą liczbę ponad dwóch tysięcy kleszczy, w tym ponad 1050 okazów zebranych metodą flagowania na rekreacyjnych terenach Poznania i ponad 1250 samic z ponad tysiąca żywicieli. Pozyskanie tak dużego materiału wymagało z pewnością bardzo dużego nakładu pracy, dużej systematyczności i dobrego zorganizowania, a także nawiązania licznych kontaktów z weterynarzami, bowiem, jak podano, materiał był zbierany w 17 lecznicach weterynaryjnych. W rozdziale „Wprowadzenie i główne cele rozprawy doktorskiej” Doktorantka zawarła też informacje dotyczące wykorzystanych molekularnych metod detekcji patogenów, których dokładny opis zawarty jest w załączonych publikacjach. Jednocześnie chciałabym zwrócić uwagę na umiejętność Doktorantki w biegłym posługiwaniu się technikami biologii molekularnej, co ma





szczególne znaczenie przy szacowaniu występowania i określaniu potencjału zoonotycznego patogenów chorób odkleszczowych.

W kolejnym rozdziale „**Rezultaty i wnioski rozprawy doktorskiej**” Doktorantka w kolejnych podrozdziałach w sposób syntetyczny opisała występowanie i współwystępowanie w kleszczach drobnoustrojów z rodzaju *Babesia* i *Borrelia* uwzględniając wyniki uzyskane w pracach wchodzących w skład rozprawy. W artykule oznaczonym jako A.1 Doktorantka przedstawiła badania kleszczy w kierunku *Babesia canis*. Warto podkreślić, że badania obejmowały nie tylko kleszcze zebrane na terenie miejskim, ale też leśnym, dlatego też wydaje się słuszne, aby dodatkowym, szczegółowym celem rozprawy było też porównanie poziomu zakażenia *Babesia* kleszczy zebranych w odmiennych ekosystemach. W artykule A.2 Autorka zawarła wyniki dotyczące zakażeń *Borrelia miyamotoi* zarówno kleszczy zebranych z roślinności, jak i pozyskanych ze zwierząt towarzyszących na terenie Poznania podkreślając jednocześnie obecność krętków z grupy gorączek powrotnych w larwach, co potwierdza możliwość transowarialnego przekazu tego patogenu. W trzeciej pracy oznaczonej jako M.1 Doktorantka analizowała występowanie i współwystępowanie krętków z kompleksu *B. burgdorferi* s.l., w tym *B. afzelii* i *B. garinii* – gatunków odpowiedzialnych za największą liczbę przypadków boreliozy w Europie - oraz pierwotniaków z rodzaju *Babesia* w kleszczach *I. ricinus* zebranych z roślinności oraz samic tego gatunku pozyskanych ze zwierząt towarzyszących. W ostatnim podrozdziale zatytułowanym „Współwystępowanie gatunków z rodzajów *Babesia* oraz *Borrelia* z grupy LB” Doktorantka oszacowała ogólny poziom koinfekcji *Babesia* oraz *Borrelia*, wskazując jednocześnie na współwystępowania gatunków potencjalnie patogennych dla człowieka. W rozdziale tym zawarła również najważniejsze wnioski wynikające z pracy.

Do najistotniejszych, moim zdaniem, osiągnięć należy:

1. Oszacowanie prevalencji *Borrelia burgdorferi* s.l., *Borrelia miyamotoi* oraz *Babesia* spp. w kleszczach zebranych zarówno z roślinności, jak i zwierząt towarzyszących na terenie Poznania, przy jednoczesnym wykryciu sekwencji drobnoustrojów identycznych ze szczepami chorobotwórczymi, co wskazuje na ryzyko infekcji na terenach miejskich zarówno ludzi, jak i zwierząt towarzyszących zróżnicowanymi patogenami odkleszczowymi.
2. Potwierdzenie roli psów i kotów jako żywicieli kleszczy na terenach miejskich oraz potencjalnego udziału zwierząt towarzyszących w utrzymywaniu zoonotycznych cykli krążenia patogenów na tych terenach, co ma szczególne znaczenie przy poznaniu kompleksowych interakcji w układzie kleszcz-patogen-żywiciel na terenach zurbanizowanych.
3. Wykrycie obecności *Babesia canis* typu A u *Ixodes ricinus*, co wskazywać może na potencjalną rolę kleszcza pospolitego jako alternatywnego wektora babeszjozy psów (przy jednoczesnym wykazaniu niższego poziomu infekcji kleszczy pospolitych pierwotniakami *Ba. canis* na terenach miejskich niż leśnych). Osiągnięcie to jest szczególnie istotne w aspekcie szacowania zagrożenia babeszjozą psów na terenach, gdzie nie występuje lub występuje jedynie sporadycznie kleszcz łąkowy *Dermacentor reticulatus* uznany w Polsce za główny wektor *Ba. canis*.
4. Wykrycie w kleszczach pospolitych *I. ricinus* zebranych zarówno z roślinności, jak i zwierząt towarzyszących koinfekcji różnymi gatunkami *Babesia* i *Borrelia*,





jak i współwystępowania mikroorganizmów z różnych grup systematycznych, tj. pierwotniaków rodzaju *Babesia* i bakterii z rodzaju *Borrelia*. Wykrycie współwystępowania zróżnicowanych patogenów o potencjale zoonotycznym wskazuje na potencjalną możliwość ich równoczesnego przekazania w czasie jednokrotnego żerowania kleszcza, czego konsekwencją może być nietypowy przebieg kliniczny.

W spisie cytowanej literatury zawartej w opracowaniu wymienianych jest 81 pozycji, w tym artykuły anglojęzyczne z ostatnich lat. Nie widzę jednak w spisie literatury kilku prac, na które powołuje się Doktorantka w manuskrypcie, np. pracy Czarkowski i wsp. 2021, na którą Doktorantka powołuje się na str. 12, a także pracy Jahfari i wsp. 2016 oraz pracy Cutler i wsp. 2020 przywoływanych na str. 14 (być może jest to praca Jahfari i Sprong 2016 oraz praca Cutler i wsp. 2021). Nie zostało też rozróżnione, czy praca Mierzejewskiej i wsp. z 2015 r., na którą powołuje się Doktorantka na str. 17 dotyczy pozycji Mierzejewska i wsp. 2015 a czy b. W pracy zauważyłam też drobne nieścisłości i nieliczne błędy edytorskie (w tym np. brak spacji, zbędne przecinki, kropki, literówki, brak kursywy przy niektórych nazwach rodzajowych i gatunkowych), a także nie zawsze logiczne sformułowania (np. na str. 12 „Wektorami krętków RFGB są głównie kleszcze miękkie ..., stad te gatunki notowane są w regionach tropikalnych i subtropikalnych”, czy na str. 13 „... *Babesia* to pasożyty erytrocytów kręgowców, które należą do rzędu Piroplasmida ...”). Omyłkowo chyba podano na str. 19, że przebadano 6 larw *I. ricinus* pochodzących ze zwierząt, bowiem jak wynika z tekstu załączonej publikacji, ze zwierząt pozyskano jedynie samice i nimfy kleszcza pospolitego. Warto przy pisaniu pracy zachować konsekwentnie formę bezosobową.

W mojej ocenie praca nie zawiera istotnych błędów rzeczowych, jednak pewne kwestie wymagają uściślenia lub doprecyzowania:

1. W streszczeniu na stronie 6 napisano, że zidentyfikowano gatunki należące do krętków powodujących LB: *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. lusitaniae*, *B. valaisiana*, natomiast w rozdziale 4 na str. 12 jako patogenne dla człowieka podano jedynie 6 gatunków, wśród których nie wymieniono *B. lusitaniae* i *B. valaisiana*, choć wydaje się, że również te gatunki posiadają potencjał patogenny.
2. W rozdziale 4 (str. 12) Autorka wspomina, że człowiek jest atakowany przez nimfy oraz samice i tylko te dwa stadia rozwojowe są zagrożeniem dla ludzi i zwierząt domowych. Stwierdzenie to jest jednak moim zdaniem pewnym uproszczeniem, bowiem, choć niewątpliwie prawdą jest, że nimfy, a w dalszej kolejności samice są najczęściej zbieranym stadiem rozwojowym kleszczy z pacjentów, jednak nie można wykluczyć pasożytowania larw, co w przypadku patogenów przenoszonych transowarialnie może stanowić potencjalne zagrożenie zdrowotne. Na tą kwestię Doktorantka zwraca uwagę w kolejnym rozdziale (str. 20).
3. Na stronie 12 Autorka podaje, że „Zapadalność na boreliozę ludzi i psów zależy od odsetka zakażonych kleszczy..”. warto moim zdaniem zwrócić również uwagę na liczebność kleszczy w środowisku, która bezpośrednio może wpływać na częstość infestacji tymi ektopasożytami, a tym samym może zwiększać prawdopodobieństwo potencjalnego kontaktu z patogenami przy porównywalnym poziomie zakażenia kleszczy.
4. Biorąc pod uwagę dostępność kluczy do oznaczania młodocianych stadiów kleszczy byłabym wdzięczna za informację, czy stadia młodociane kleszczy zidentyfikowano





wyłącznie metodami molekularnymi, czy też pokuszono się o identyfikację metodami tradycyjnymi, tj. na podstawie morfologii w oparciu o dostępne klucze do oznaczania Ixodida.

5. Nieco zaskakujący jest dla mnie wniosek przedstawiony w punkcie 4, bowiem wydaje mi się łatwiejsze – z uwagi na dostępność materiału do badań - szacowanie ryzyka zakażenia *Borrelia miyamotoi* w oparciu o określanie poziomu prevalencji tej bakterii w kleszczach zebranych z roślinności niż w kleszczach zebranych ze zwierząt.
6. Sądzę, że warto przy podawaniu danych dotyczących liczby kleszczy zebranych ze zwierząt towarzyszących uwzględnić wszystkie pozyskane gatunki i stadia rozwojowe, bowiem śledząc informacje zawarte na str. 15 można odnieść wrażenie, że z psów i kotów pozyskano jedynie samice zidentyfikowane jako *I. ricinus*. O innych zebranych z żywicieli stadiach rozwojowych *I. ricinus* i innych gatunkach kleszczy można się dowiedzieć dopiero z tekstu załączonej publikacji (A.2).
7. Warto byłoby moim zdaniem w założonych celach, jak już wspominałam, uwzględnić szacowanie potencjalnych różnic w poziomie zakażenia pierwotniakami *Ba. canis* między kleszczami pospolitymi zebranymi na terenach leśnych i zurbanizowanych, co było przedmiotem badań pierwszej pracy (A.1) wchodzącej w skład cyklu, a także o porównanie poziomu zakażenia kleszczy zebranych z roślinności i pozyskanych od zwierząt, co było przedmiotem kolejnych, interesujących prac (A.2 i M.1).
8. Prosiłabym o wyjaśnienie dotyczące zarówno liczby kleszczy pozyskanych z psów i kotów, jak i potencjalnych wyjazdów zwierząt towarzyszących. Z opisu zamieszczonego pod tabelą 2. (str. 16) wynika, że zawarte w publikacji A.2. dane dotyczące pozyskanych kleszczy zostały dodatkowo uzupełnione o kleszcze, dla których żywicieli nie był jednoznacznie określony. Rozumiem jednak, że w tabeli nie uwzględniono zebranych nimf, o których wspomniano w publikacji A.2 oraz że dane zawarte w manuskrypcie M.1 uzupełniono również o kleszcze, o których było wiadomo czy zostały zebrane z psów czy kotów. Przy interpretacji wyników ważna jest też informacja o potencjalnych wyjazdach psów poza miasto: z pracy A.2 wynika, że w badanej grupie były zarówno psy przebywające wyłącznie w mieście, jak i psy wyjeżdżające poza miasto, natomiast w manuskrypcie M.1 w materiałach i metodach (str. 57) podane jest, że zwierzęta z których pozyskano kleszcze nie wyjeżdżały poza miasto.
9. We fragmencie dyskusji zamieszczonej w publikacji M.1 a dotyczącej konfekcji *Borrelia* i *Babesia* u kleszczy zebranych ze zwierząt towarzyszących warto moim zdaniem również odnieść do publikacji Kocoń i wsp. (2022), w której opisana jest koinfekcja *Babesia microti* i *B. burgdorferi* s.l.
10. Ponieważ głównym tematem przedstawionej do oceny rozprawy były koinfekcje zastanawia mnie, czy podjęto próbę analizy potencjalnego synergistycznego lub antagonistycznego wzajemnego wpływu współwystępujących mikroorganizmów.

Podsumowując chciałabym podkreślić, że praca jest wartościowa, a wymienione powyżej uwagi mają charakter jedynie drugoplanowy i nie wpływają na zasadniczą część pracy. Rozprawa doktorska Pani mgr Justyny Liberskiej dostarcza nie tylko nowych danych o poziomie infekcji kleszczy pospolitych zebranych z roślinności i zwierząt towarzyszących



mikroorganizmami *Babesia* spp., *Borrelia miyamotoi* oraz *Borrelia burgdoeferi* s.l., ale także zwraca uwagę na współwystępowanie patogenów i dostarcza nowych informacji o interakcji wektor-patogen-żywiciel w środowisku miejskim. Doktorantka zastosowała nowoczesny warsztat badawczy, a uzyskane wyniki mają wartość nie tylko naukową, ale też aplikacyjną, szczególnie istotną w aspekcie ochrony zdrowia publicznego.

**Wniosek końcowy.** Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Justyny Liberskiej pt. „Współwystępowanie *Babesia* spp. (Apicomplexa: Piroplasmida) i *Borrelia* spp. (Bacteria: Spirochaetes) w kleszczach pospolitych, *Ixodes ricinus*, na terenach zurbanizowanych na przykładzie Poznania” spełnia wszystkie warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 r. poz. 742), w związku z tym wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza o dopuszczenie Pani mgr Justyny Liberskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.