



Olsztyn, dnia 31 sierpnia 2022r.

Dr hab. Małgorzata Dmitryjuk, prof. UWM
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
Wydział Biologii i Biotechnologii
Katedra Biochemii
ul. Oczapowskiego 1A
10-719 Olsztyn
m.dmit@uwm.edu.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Mgr Anny Weroniki Myczki

pt.

Prewalencja i genotypowanie szczepów *Anaplasma phagocytophilum* wśród zwierząt kopytnych w Polsce

przygotowanej pod kierunkiem Promotora – dra. hab. Zdzisława Laskowskiego, profesora IP PAN,
i Promotora pomocniczego dra. Witolda Jeżewskiego,
Instytut Parazytologii im. Witolda Stefańskiego, Polska Akademia Nauk w Warszawie

Podstawą wydania opinii jest pismo prof. dr hab. Bożeny Moskwy – Dyrektora Instytutu Parazytologii im. Witolda Stefańskiego PAN z dnia 4-go lipca 2022r. (S-051-18/2022) oraz dokumentacja w postaci papierowej wersji pracy doktorskiej i na płycie CD nadesłane w dniu 6-go lipca 2022r. pocztą kurierską.

Mgr Anna Weronika Myczka przedstawiła do oceny pracę doktorską, składającą się z cyklu trzech powiązanych tematycznie prac oryginalnych, opublikowanych w latach 2021-2022, w czasopiśmie znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) posiadających wskaźnik oddziaływania Impact Factor (IF):

1. **Myczka A.W.**, Szewczyk T., Laskowski Z. The Occurrence of Zoonotic *Anaplasma phagocytophilum* Strains, in the Spleen and Liver of Wild Boars from North-West and Central Parts of Poland. *Acta Parasitol.* 2021 Sep;66(3):1082-1085. doi: 10.1007/s11686-021-00368-6
Wskaźnik Impact Factor: 1,440 (IF₂₀₂₁ = 1,534); Punkty MEiN: 40
2. **Myczka A.W.**, Steiner-Bogdaszewska Ż., Filip-Hutsch K., Ołoś G., Czopowicz M., Laskowski Z. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Wild and Farmed Cervids in Poland. *Pathogens.* 2021 Sep 14;10(9):1190. doi:10.3390/pathogens10091190
Wskaźnik Impact Factor: 4,066 (IF₂₀₂₁ = 4,531); Punkty MEiN: 100
3. **Myczka A.W.**, Kaczor S., Filip-Hutsch K., Czopowicz M., Plis-Kuprianowicz E., Laskowski Z. Prevalence and Genotyping of *Anaplasma phagocytophilum* Strains from Wild Animals, European Bison (*Bison bonasus*) and Eurasian Moose (*Alces alces*) in Poland. *Animals.* 2022; 12(9):1222. doi.org/10.3390/ani12091222
Wskaźnik Impact Factor: 2,942 (IF₂₀₂₁ = 3,231); Punkty MEiN: 100

Łączny IF₂₀₂₁ prac zaliczonych do ocenianego cyklu jest wysoki i wynosi IF = 9,296 (240 pkt MEiN).

Przedstawione prace są wieloautorskie, a mgr Anna Myczka jest pierwszym i jednocześnie korespondencyjnym autorem. Według załączonych oświadczeń, wkład Doktorantki w powstanie





publikacji był znaczący i polegał na pobieraniu materiału biologicznego, wykonaniu badań z zakresu biologii molekularnej oraz części analiz filogenetycznych i statystycznych, interpretacji i opracowaniu wyników oraz na przygotowaniu i redagowaniu tekstów prac. Wszyscy pozostali współautorzy określili swój udział w powstanie publikacji i wyrazili zgodę na przedłożenie powyższego cyklu publikacji jako rozprawy doktorskiej przez mgr A. Myczkę.

W przedstawionej do oceny pracy doktorskiej, zbiór trzech publikacji jest poprzedzony wprowadzeniem w języku polskim, który zawiera: *Spis treści, Wykaz skrótów, Cele pracy i hipotezy badawcze, Cykl publikacji będący podstawą rozprawy doktorskiej, Streszczenie* (w języku polskim i angielskim), *Materiały i Metody*. Każda z ułożonych chronologicznie publikacji poprzedzona jest stroną tytułową, na której Doktorantka zamieściła wkład własny w powstanie pracy. Oświadczenia współautorów zostały umiejscowione za publikacjami zaliczonymi do cyklu ocenianych prac. Następnie, mgr A. Myczka zamieściła rozdział *Najważniejsze wyniki i wnioski*, które omówiła kolejno dla publikacji 1-3. Następny rozdział rozprawy to *Genotypowanie szczepów *Anaplasma phagocytophilum* izolowanych od saren europejskich (*Capreolus capreolus*) i jeleni szlachetnych (*Cervus elaphus*)*, który poprzedza rozdziały *Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie* oraz *Wnioski*. Na końcu rozprawy umieszczono *Piśmiennictwo*. Całość przedstawionej do recenzji dysertacji liczy 101 stron. Publikacje wraz ze zwięzłym wprowadzeniem, omówieniem i podsumowaniem stanowią istotę nowoczesnej pracy doktorskiej. Praca ma przejrzystą, nieprzeładowaną strukturę i jest napisana poprawnym językiem naukowym. Wszystkie publikacje składające się na dysertację doktorską ukazały się w recenzowanych czasopismach naukowych, w których już wcześniej redakcje czasopism i recenzenci dokonali ich oceny merytorycznej, ich tematyka jest powiązana ze sobą i dotyczy detekcji oraz genotypowania *A. phagocytophilum* łącznie u sześciu gatunków zwierząt kopytnych.

I. Znaczenie podjętej problematyki badawczej

Podjęte przez Doktorantkę badania posiadają szerszy aspekt niż tylko aspekt poznawczy. Anaplazmoza granulocytna jest zakaźną chorobą ludzi i zwierząt. Choroba występuje na całym świecie. W Polsce notuje się przypadki anaplazmozy granulocytarnej u zwierząt oraz materiał genetyczny patogenu w kleszczach pochodzących z różnych rejonów naszego kraju. Ludzka anaplazmoza granulocytna (HGA) jest zoonotyczną chorobą gorączkową zwykle o ostrym przebiegu, zaliczaną do niedawna do grupy tzw. chorób rozprzestrzeniających się („emerging infectious diseases”). Objawy anaplazmozy są niespecyficzne i choroba jest trudna do rozpoznania. Zwykle HGA objawia się gorączką z dreszczami, bólami głowy i mięśni, nudnościami, wymiotami, biegunką i ogólnym osłabieniem. W obrazie krwi notowana jest trombocytopenia, leukopenia oraz wzrost aktywności aminotransferaz. Szacuje się, że od 5 do 7 % pacjentów przechodzi najcięższą postać choroby. Na świecie zanotowano do tej pory siedem przypadków śmiertelnych HGA. Czynnikiem etiologicznym anaplazmozy jest *Anaplasma phagocytophilum* (Rickettsiales: Anaplasmataceae), Gram-ujemna bakteria, zasiedlająca głównie granulocyty krwi obwodowej ludzi i zwierząt. Obecnie gatunek *A. phagocytophilum* obejmuje znane do 2001r.: *Ehrlichia phagocytophila*, wywołującą chorobę owiec i bydła, *Ehrlichia equi*, będącą czynnikiem erlichiozy granulocytarnej koni oraz czynnik ludzkiej erlichiozy granulocytarnej. W obrębie *A. phagocytophilum* wyróżnia się wariant chorobotwórczy, który jest wykrywany u ludzi, kleszczy, psów i koni oraz wariant nie wywołujący objawów chorobowych, wykrywany u kleszczy i saren. Wektorami *A. phagocytophilum* są kleszcze z rodzaju *Ixodes* (głównie *Ixodes ricinus* ale też *Ixodes pacificus*, *Ixodes scapularis* czy *Ixodes persulcatus*, w Azji i europejskiej części Rosji również *Dermacentor silvarum*). Zwierzętami rezerwuarnymi dla *A. phagocytophilum* są przede wszystkim: zwierzyna płowa, niektóre zwierzęta hodowlane, małe gryzonie oraz zwierzęta domowe. Wobec narastającego zarażenia zwierząt





rezerwuarowych oraz kleszczy i innych wektorów bakterią *A. phagocytophilum*, w Polsce istnieje realne zagrożenie rozprzestrzeniania się anaplazmozy. Genotypowanie szczepów *A. phagocytophilum* u zwierząt kopytnych w Polsce, którego podjęła się mgr A. Myczka pozwoliło na wykazanie, że szczepy bakterii *A. phagocytophilum* występujące u tych zwierząt w Polsce mają sekwencje w 100% identyczne i grupują się podczas analizy filogenetycznej ze szczepami bakterii wykrytych u człowieka. Jest to niezwykle ważne spostrzeżenie z epidemiologicznego punktu widzenia i wpisuje się w nurt badań „One Health”.

II. Analiza rozprawy doktorskiej

Na początku dysertacji Autorka przedstawiła *Cele pracy i hipotezy badawcze*. Jest to trochę nietypowe miejsce dla tego rozdziału. Zwykle cele i hipotezy badawcze umieszcza się po wprowadzeniu (wstępie) pracy. Może to budzić pewne zaskoczenie dla czytelnika ale z pewnością Doktorantka posiada uzasadnienie takiej a nie innej kolejności rozdziałów, które mam nadzieję przedstawi podczas obrony pracy. Według mnie, cele pracy zostały jasno sformułowane a następnie osiągnięte w trakcie realizacji zadań badawczych przedstawionych w cyklu trzech prac zaliczonych do pracy doktorskiej. Głównymi celami Doktorantki było określenie prevalencji *A. phagocytophilum* u sześciu gatunków zwierząt kopytnych, jak również porównanie poziomów prevalencji tej bakterii u jelenia szlachetnego (gatunek dziki) i daniela zwyczajnego (gatunek hodowlany), charakterystyka szczepów *A. phagocytophilum* z zastosowaniem różnych markerów genetycznych oraz porównanie użyteczności tkanek śledziony i wątroby jako organów do badań nad detekcją *A. phagocytophilum* u zwierząt kopytnych. Uważam za słuszne podejście mgr A. Myczki do podjęcia się analizy porównawczej między różnymi gatunkami zwierząt rezerwuarowych oraz dwoma rodzajami tkanek użytych do detekcji *A. phagocytophilum*. Na uwagę zasługuje również fakt wykorzystania aż trzech markerów genetycznych (16S rDNA, *groEL* i *ankA*) do identyfikacji bakterii w tkankach zwierząt. Takie podejście Doktorantki do realizacji założonych celów czyni niniejsze badania kompleksowymi i wiarygodnymi.

Przedstawione w pracy cztery hipotezy badawcze zostały potwierdzone i znalazły swoje odzwierciedlenie we wnioskach zamieszczonych na końcu dysertacji. W wyniku realizacji zadań badawczych i analizy wyników Autorka udowodniła, że *A. phagocytophilum* powszechnie występuje u dzikich zwierząt kopytnych w Polsce. Nie jest to spostrzeżenie nowe, jednak ilość badanych gatunków zwierząt rezerwuarowych jest tutaj znaczna w porównaniu do wcześniejszych badań tego typu w naszym kraju. Doktorantka wykazała także, że zwierzęta kopytne w Polsce są rezerwuarem potencjalnie zoonotycznych gatunków *A. phagocytophilum*, prevalencja omawianej bakterii jest wyższa u zwierząt dzikich niż u hodowlanych a tkanka śledziony stanowi bardziej wydajne źródło materiału biologicznego do detekcji czynnika etiologicznego anaplazmozy. Są to informacje nowe albo uzupełniające dotychczasowe wyniki badań i z tego względu niezwykle istotne dla innych badaczy zajmujących się tym zagadnieniem.

We *Wstępie* pracy Autorka przedstawia charakterystykę bakterii *A. phagocytophilum*, omawia następnie markery genetyczne używane do identyfikacji tej bakterii w materiale biologicznym, co moim zdaniem powinna uczynić na końcu rozdziału. Następnie Doktorantka opisuje rezerwuary i wektory bakterii. Na końcu *Wstępu* przedstawia ujęcie projektu „One Health” w powiązaniu z HGA, co wpisuje się w obecny trend rozpatrywania zdrowia ludzi i zwierząt w kontekście chorób zoonotycznych na świecie.

W rozdziale *Materiały* Autorka przedstawia sposoby pozyskiwania materiału biologicznego do analiz. Informacje te uzupełnia czytelna mapa przedstawiająca rozmieszczenie geograficzne miejsc poboru prób oraz tabela zawierająca informacje na temat liczebności badanych 305 osobników.





We wspomnianej tabeli zwraca uwagę fakt, że Doktorantka nie podała w niej kategorii wiekowej dzików tak, jak to uczyniła w przypadku innych gatunków badanych zwierząt. Chciałabym zapytać, czy Autorka nie miała takich informacji, czy były one niepełne i dlatego ich nie zamieściła?

W **Materiałach** mgr A. Myczka w rzetelny sposób przedstawiła również zgody na pobieranie materiału biologicznego od zwierząt objętych różnymi formami ochrony gatunkowej.

W rozdziale **Metody** Autorka przedstawia procedurę izolacji DNA oraz analiz molekularnych. Dokładnie opisuje warunki reakcji PCR. Na uwagę zasługuje fakt, że pary starterów do reakcji PCR i nested-PCR (dla genów 16S rDNA i *ankA*) zostały zaprojektowane w Zakładzie Ekologii i Ewolucji Pasożytnictwa Instytutu Parazytologii im. Witolda Stefańskiego PAN w Warszawie. Tylko w przypadku markeru genetycznego *groEL* Doktorantka wykorzystała startery z dostępnej literatury.

W rozdziale **Najważniejsze wyniki i wnioski** Autorka omawia główne osiągnięcia poszczególnych prac wchodzących do cyklu pracy doktorskiej:

Publikacja nr 1:

Pierwsza z prezentowanego cyklu publikacji posiada status SHORT COMMUNICATION i dotyczy detekcji *A. phagocytophilum* u dzików euroazjatyckich. W wyniku przeprowadzonych badań wykazano obecność bakterii u 20% badanych osobników. Autorzy dowiedli, że dziki występujące w Polsce mogą być traktowane jako naturalny rezerwuuar szczepów zoonotycznych *A. phagocytophilum*, potencjalnie chorobotwórczych dla człowieka. Dodatkowo, zarówno tkanki śledziony jak wątroby w przypadku dzików stanowią użyteczne źródło materiału biologicznego do detekcji DNA badanej bakterii. W przypadku poboru prób zauważyłam pewną nieścisłość. W publikacji Autorzy podają, że próby tkanek były zebrane z 59 dzików w latach 2017-2019. W rozdziale **Materiały** mgr A. Myczka pisze: "Od 2018 roku zbiór prób biologicznych od dzików euroazjatyckich nie był możliwy z powodu ASF." (str. 24, linia 5-6). Bardzo bym prosiła Doktorantkę o wyjaśnienie tej rozbieżności podczas obrony.

Publikacja nr 2:

Druga z cyklu prac dotyczy występowania *A. phagocytophilum* u jeleniowatych, gdzie zanotowano prevalencję na poziomie powyżej 50% u saren i jeleni, 18% u łosi zaś u danieli zwyczajnych nie wykryto bakterii z rodzaju *Anaplasma*. Autorzy zanotowali, że *A. phagocytophilum* występuje częściej w tkankach śledziony u młodych osobników jeleniowatych. Jest to bardzo ważne i interesujące spostrzeżenie. Znaczyłoby to, że prawdopodobnie dochodzi do samowyleczenia u starszych zwierząt?

Chciałabym poznać opinię Doktorantki w tej kwestii podczas obrony. Dodatkowo, po raz pierwszy na świecie poddano analizie śledziony i wątroby łosi w celu detekcji *A. phagocytophilum*. Ważnym osiągnięciem recenzowanej pracy doktorskiej jest wykazanie przez Autorów występowania osobnego i unikatowego szczepu *A. phagocytophilum*, który wstępnie określili jako "*Anaplasma phagocytophilum* roe deer strain"

Publikacja nr 3:

Trzecia publikacja z cyklu dotyczy żubra europejskiego i łosia euroazjatyckiego, u których prevalencja *A. phagocytophilum* wynosiła odpowiednio 24% i 30%. Te dwa gatunki największych przeżuwaczy w Polsce są również, zdaniem Autorów, naturalnym rezerwuarem bakterii z rodzaju *Anaplasma*. Ponad to, podczas analizy genotypowania Autorzy wykazali, że wszystkie trzy badane markery genetyczne u obu gatunków zwierząt są identyczne albo grupują się ze szczepami HGA a zatem są potencjalnie chorobotwórcze dla ludzi. Z epidemiologicznego punktu widzenia jest to niezwykle ważna informacja, uzupełniająca dotychczasowy stan wiedzy na temat naturalnych rezerwuarów *A. phagocytophilum*.





Genotypowanie szczepów *Anaplasma phagocytophilum* izolowanych od saren europejskich (*Capreolus capreolus*) i jeleni szlachetnych (*Cervus elaphus*)

Po omówieniu najważniejszych wyników i wniosków publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej, Doktorantka w dodatkowym podrozdziale uzupełniła informacje na temat genotypowania szczepów *A. phagocytophilum* u saren i jeleni szlachetnych. Podrozdział ten jest ważną częścią pracy, która zawiera opracowane drzewa filogenetyczne fragmentów genów *groEL* (486 pz) oraz *ankA* (633 pz). Poddawane analizie fragmenty genów nie są zbyt duże, zwłaszcza genu *groEL*. Czy zdaniem Autorki są wystarczające długie i dlaczego?

W rozdziale **Dyskusja** Autorka umiejętnie dyskutuje najważniejsze wyniki własnych badań na tle licznych doniesień literaturowych. Chociaż rozdział jest stosunkowo krótki, to przebieg dyskusji jest uporządkowany i merytoryczny. Jest to kolejny dowód na to, że Doktorantka jest dojrzałym i wnikliwym pracownikiem naukowym. Moją szczególną uwagę zwróciła tutaj następująca informacja: "*Szczepy *A. phagocytophilum* od saren europejskich, te które są charakterystyczne dla tego gospodarza, nie wykazują podobieństw do szczepów zoonotycznych. Jednak z uwagi na to, że sarny mogą być nosicielami nie specyficznych dla gatunku szczepów *A. phagocytophilum* (jak sarna S36), to nie można wykluczyć, że wśród saren europejskich będzie się wykrywać zoonotyczne szczepy *A. phagocytophilum*.*"

Moim zdaniem jest to kolejny dowód na rozprzestrzenianie się wariantów genetycznych *A. phagocytophilum* chorobotwórczych dla człowieka u nowych gatunków żywicieli.

W rozdziale **Podsumowanie** Autorka przedstawia w 10 punktach najważniejsze osiągnięcia pracy doktorskiej, dotyczące ilości przebadanych osobników, prevalencji *A. phagocytophilum* u poszczególnych gatunków zwierząt, wyników sekwencjonowania pozwalających na klasyfikację gatunkową patogenu, identyfikacji haplotypów genu 16S rDNA, *groEL* i *ankA* oraz analizy filogenetycznej genów *groEL* i *ankA* *A. phagocytophilum*. Rozdział ten w skrócony sposób eksponuje najważniejsze wyniki zawarte w dysertacji i stanowi realne podsumowanie wykonanych przez Doktorantkę i Współautorów analiz.

W rozdziale **Wnioski** Autorka przedstawiła siedem wniosków. Pierwsze cztery z nich sformułowane przez Doktorantkę są potwierdzeniem hipotez badawczych umieszczonych na początku dysertacji. Dodatkowo, Autorka zamieściła trzy kolejne. Dwa zostały sformułowane na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej i dotyczą częstszego występowania *A. phagocytophilum* u zwierząt młodych i wyższej prevalencji omawianego patogenu u samic niż u samców zwierząt rezerwuarnych. W ostatnim siódmym wniosku autorka zawarła nową hipotezę: "*..., że gatunek sarny europejskiej (*Capreolus capreolus*) jest gospodarzem szczepu *A. phagocytophilum* charakterystycznego tylko dla tego gatunku (*Anaplasma phagocytophilum* roe deer strain) lub nowego szczepu bakterii z rodzaju *Anaplasma* tymczasowo nazwanego *Anaplasma capreolus*.*" W tym miejscu chciałabym zapytać, czy Doktorantka zamierza kontynuować badania dotyczące tej hipotezy? Innymi słowy, czy jest to zadanie badawcze, które chce zrealizować w najbliższej przyszłości?

Rozdział **Piśmiennictwo** obejmuje spis 93 pozycji literatury przedmiotu z Polski i świata. Prawie wszystkie pozycje ze spisu zostały opublikowane w języku angielskim. Dodatkowo, Autorka zamieściła **Spis stron internetowych**, z których korzystała podczas pisania pracy doktorskiej.

Na zakończenie chciałabym nadmienić, że w pracy znajdują się nieliczne błędy interpunkcyjne i językowe, niepotrzebne rozwinięcia skrótów, które znalazły się wcześniej w **Wykazie skrótów** oraz zbędne całe nazwy gatunkowe badanego patogenu w tekście pracy (pełną nazwę gatunkową "*Anaplasma phagocytophilum*" należało użyć raz a potem wersję skróconą "*A. phagocytophilum*", zasady tej nie stosuje się zwyczajowo tylko w tytułach tabel, podpisach rysunków i nagłówkach). Te niewielkie uchybienia nie mają jednak wpływu na moją wysoką ocenę pracy.





III. Podsumowanie

Przedstawiona do recenzji praca doktorska wnosi w wielu aspektach nowy wkład w rozwój reprezentowanej dyscypliny naukowej, posiada przejrzystą strukturę i jest napisana poprawnym językiem naukowym. Publikacje zaliczone do cyklu prac zostały opublikowane w czasopismach znajdujących się w bazie JCR, posiadających wskaźnik oddziaływania IF.

W świetle wszystkich powyższych argumentów stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji dysertacja doktorska Pani **mgr Anny Weroniki Myczki** w postaci cyklu publikacji zebranych pod wspólnym tytułem: **"Prewalencja i genotypowanie szczepów *Anaplasma phagocytophilum* wśród zwierząt kopytnych w Polsce"** wnosi znaczący wkład w rozwój dyscypliny nauki biologiczne i odpowiada warunkom określonym w art. 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, i może być podstawą do nadania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie biologia, w postępowaniu prowadzonym na podstawie Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1 789 ze zm.), w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. – przepisy wprowadzające Ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm. W Dz. U. z 22 marca 2019 r. poz. 534). **W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Parazytologii im. Witolda Stefańskiego Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr Anny Weroniki Myczki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Małgorzata Dmitryjuk



