

Załącznik nr 2 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

AUTOREFERAT

Dr n. wet. Jolanta Grażyna Rola

Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego
Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy
w Puławach

Puławy 2016

1. Imię i nazwisko: Jolanta Grażyna Rola

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

- **tytuł:** lekarz weterynarii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej AR w Lublinie, (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy), 1984 r.

- **tytuł:** specjalista z zakresu: Higiena zwierząt rzeźnych i żywności zwierzęcego pochodzenia, Puławy 2006 r.

- **stopień naukowy:** doktor nauk weterynaryjnych, Państwowy Instytut Weterynaryjny w Puławach, 2002 r., tytuł rozprawy doktorskiej: „Występowanie *Listeria monocytogenes* w mleku surowym i jej przeżywalność podczas produkcji i przechowywania wybranych produktów mlecznych”.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych:

- Państwowy Instytut Weterynaryjny-Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego, od 1.11.1984 r. do chwili obecnej.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 2 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.)

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego:

„Występowanie gronkowców koagulazo-dodatnich i enterotoksyn gronkowcowych w mleku i produktach mlecznych. Badania biegłości jako element strategii zapewnienia jakości i bezpieczeństwa mleka i produktów mlecznych w Polsce”

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, nazwa wydawnictwa, rok wydania, impact factor IF i punktacja MNiSW aktualna w roku publikacji)

Publikacje oryginalne:

4.1. **Rola J.G.**, Korpysa-Dzirba W., Czubkowska A., Osek J.: Prevalence of enterotoxin genes and antimicrobial resistance of coagulase – positive staphylococci recovered from raw cow milk. *Journal of Dairy Science* 2015, 98, 4273-4278, (IF_{2014/2015} = 2,573; punkty MNiSW = 45)

4.2. **Rola J.G.**, Sosnowski M., Ostrowska M., Osek J.: Prevalence and antimicrobial resistance of coagulase-positive staphylococci isolated from raw goat milk. *Small Ruminant Research* 2015, 123, 124-128 (IF_{2014/2015} = 1,125; punkty MNiSW = 30)

4.3. **Rola J.G.**, Korpysa-Dzirba W., Osek J.: Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins at different stages of production of raw milk cheeses - preliminary results. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 2013, 57, 341-345, (IF₂₀₁₃ = 0,365; punkty MNiSW = 20)

4.4. **Rola J.G.**, Czubkowska A., Korpysa-Dzirba W., Osek J.: Occurrence of *Staphylococcus aureus* on farms with small scale production of raw milk cheeses in Poland. *Toxins* 2016, 8, 62; doi:10.3390/toxins8030062, (IF_{2014/2015} = 2,938; punkty MNiSW = 30)

4.5. **Rola J.G.**: Badanie biegłości laboratoriów oceny mleka surowego poprzez porównania międzylaboratoryjne. *Medycyna Weterynaryjna* 2005, 61, 657-659, (IF₂₀₀₅ = 0,259; punkty MNiSW = 15)

4.6. **Rola J.G.**, Grudka D., Osek J.: Ocena kompetencji laboratoriów poprzez badania biegłości w zakresie mikrobiologii mleka i produktów mlecznych w latach 2008-2014. *Życie Weterynaryjne* 2015, 90, 384-386, (IF= brak; punkty MNiSW = 4)

Łączna punktacja 6 prac wchodzących w skład jednotematycznego cyklu publikacji: łączny IF – 7,26; punktacja wg MNiSW - 144 pkt.

Omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Gronkowcowe zatrucia pokarmowe (staphylococcal food poisoning, SFP) należą do najczęściej występujących na świecie chorób ludzi, przenoszonych drogą pokarmową (Argudin i wsp., 2010; Hennekinne i wsp., 2012). Do zachorowania człowieka dochodzi w wyniku spożycia żywności zanieczyszczonej enterotoksyną gronkowcową, produkowaną głównie przez enterotoksynogenne szczepy *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Objawy zatrucia takie jak ślinotok, nudności, wymioty, bóle brzucha, biegunka pojawiają się nagle, już po 2-8 godz. od spożycia zanieczyszczonej żywności i w większości przypadków ustępują samoistnie w ciągu 24-48 godz., bez konieczności stosowania swoistego leczenia (Le Loir i wsp., 2003). Niekiedy choroba ma przebieg ciężki, szczególnie u małych dzieci, osób starszych lub osób z osłabioną odpornością.

S. aureus jest drobnoustrojem szeroko rozpowszechnionym w przyrodzie, bytującym na skórze, błonach śluzowych górnych dróg oddechowych i przewodu pokarmowego człowieka i zwierząt. Bakteria ta należy także do głównych czynników zakaźnych powodujących zapalenia wymienia u krów, w wyniku czego mleko, a w konsekwencji także produkty mleczne są często zanieczyszczone gronkowcami (Waage i wsp., 1999). Przyjmuje się, że w Europie w przybliżeniu 10% serów jest produkowanych z mleka surowego co powoduje, że produkty te stanowią potencjalne zagrożenie dla zdrowia publicznego (Beuvier i Buchin, 2004). Potwierdzają to badania przeprowadzone w Szkocji które wykazały, że *S. aureus* był patogenem najczęściej izolowanym z tego rodzaju serów (Williams i Withers, 2010). Analiza przypadków zatruc pokarmowych we Francji także wykazała, że *S. aureus* był głównym drobnoustrojem związanym z zachorowaniami, których przyczyną były produkty mleczne (De Buyser i wsp., 2001). Kolejnym czynnikiem zwiększającym prawdopodobieństwo zanieczyszczenia żywności gronkowcami, zwłaszcza produktów spożywczych wytwarzanych ręcznie, jest brak przestrzegania zasad higieny podczas jej przetwarzania. Osoby będące nosicielami enterotoksynogennych szczepów *S. aureus* i uczestniczące w produkcji sera uważane są za główne źródło ich zanieczyszczenia wymienionym patogenem. André i wsp. (2008), wyizolowali *S. aureus* z wymazów pobranych z rąk i nosa od około 75% osób, które uczestniczyły w produkcji serów.

Nie wszystkie koagulazo-dodatnie szczepy *S. aureus* wytwarzają enterotoksyny, z których większość posiada silne właściwości wymiotne. Badania przeprowadzone we Włoszech (Normanno i wsp., 2007) wykazały, że 55% szczepów wyizolowanych z żywności posiadało geny kodujące klasyczne enterotoksyny gronkowcowe, podczas gdy w Norwegii (Loncarevic i wsp., 2005), wśród izolatów otrzymanych z mleka i produktów mlecznych, odsetek ten wynosił 48%. Dotychczas opisano 22 enterotoksyny gronkowcowe (SE – Staphylococcal enterotoxins) różniące się między innymi masą molekularną, punktem izoelektrycznym oraz budową antygenową (Argudin i wsp., 2010; Hennekinne i wsp., 2012). Oprócz enterotoksyn typu klasycznego (SEA-SEE) opisano szereg nowych enterotoksyno-podobnych wariantów, które oznaczane są jako SEI (staphylococcal enterotoxin-like) (Pinchuk i wsp., 2010). Enterotoksyny gronkowcowe wykazują znaczną ciepłooporność, ulegają tylko częściowej inaktywacji podczas ogrzewania w temp. 100°C przez 30 min., w związku z czym mogą być obecne w żywności poddanej obróbce termicznej, podczas gdy bakterie *S. aureus* nie są wykrywane (Le Loir i wsp., 2003). Uważa się, że liczba enterotoksynogennych gronkowców musi osiągnąć poziom przynajmniej 10^5 - 10^6 jtk/g, aby doszło do wytworzenia enterotoksyny w ilości niezbędnej do wywołania choroby. Zatrucia pokarmowe wywoływane są głównie przez enterotoksynę SEA, która odpowiada za około 75% wszystkich przypadków zachorowań na świecie, następnie przez enterotoksynę SED, a w mniejszym stopniu przez SEB i SEC. Szczepy *S. aureus* izolowane z mleka krowiego produkują głównie enterotoksyny SEC i SED (Komisja Europejska, 2003).

Według raportu Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności w Unii Europejskiej w 2013 r. zarejestrowano 386 epidemii zatruc pokarmowych wywołanych przez enterotoksyny gronkowcowe (EFSA, 2015). Większość z nich odnotowano we Francji, gdzie konsumpcja serów i wyrobów mlecznych produkowanych z mleka niepasteryzowanego jest powszechna i produkty te są częściej niż w innych krajach przyczyną zachorowań u ludzi. W Polsce w tym samym okresie zgłoszono tylko 5 potwierdzonych ognisk zachorowań wywołanych przez żywność zanieczyszczoną *S. aureus*. W naszym kraju w ostatnich latach coraz bardziej popularne są produkty spożywcze regionalne, takie jak sery podpuszczkowe produkowane z mleka niepasteryzowanego, które wytwarzane są według tradycyjnej receptury bezpośrednio w gospodarstwach mlecznych. Wśród znacznej części społeczeństwa panuje przekonanie, że produkty te są lepsze zarówno pod względem

wartości odżywczej jak i jakości, od wyrobów sprzedawanych w dużych sieciach handlowych. Niestety opinie te nie zawsze poparte są wynikami odpowiednich badań.

Jakość i bezpieczeństwo produktów mlecznych zależy przede wszystkim od jakości surowca użytego do ich produkcji. Szczegółowe wymagania odnoszące się do mleka surowego zawarte są w Rozporządzeniu Parlamentu Europejskiego i Rady nr 853/2004 z dnia 29 kwietnia 2004 r. (Dz.U. L 139 z 30.4.2004 z późn. zm.). Przepisy te kładą szczególny nacisk na jakość mikrobiologiczną i cytologiczną mleka. Zgodnie z przyjętym zapisem, w surowym mleku krowim pochodzącym z gospodarstwa produkującego mleko, liczba drobnoustrojów oznaczona metodą płytkową w temperaturze 30°C nie może przekraczać 100 000 jtk w 1 ml, a liczba komórek somatycznych oznaczona metodą ilościową 400 000 w 1 ml. Mleko surowe nie może także zawierać pozostałości antybiotyków i innych substancji hamujących.

Z kolei kryteria mikrobiologiczne dotyczące środków spożywczych zostały przedstawione w Rozporządzeniu Komisji nr 20073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. Kryteria te określają dopuszczalny poziom zanieczyszczenia produktu w zależności od rodzaju drobnoustroju (Dz.U. L. 338 z 22.12.2005 z późn. zm.). W przypadku produktów takich jak sery wyprodukowane z mleka surowego, gdy liczba gronkowców koagulazo-dodatnich w badanej próbce jest wyższa niż 10^5 jtk/g, istnieje obowiązek przeprowadzenia badań w kierunku obecności enterotoksyn gronkowcowych. Produkty o takim poziomie zanieczyszczenia mogą być dopuszczone do sprzedaży tylko wtedy, gdy nie zawierają enterotoksyn gronkowcowych.

Kluczową rolę w zapewnieniu bezpieczeństwa żywności odgrywają Krajowe Laboratoria Referencyjne (KLR), które stanowią najwyższą instancję laboratoriów badawczych w kraju i pełnią nadzór merytoryczny nad laboratoriami uprawnionymi do przeprowadzania badań w ramach kontroli urzędowych (Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady nr 882/2004/WE, Ustawa z dnia 29 stycznia 2004 r. o Inspekcji Weterynaryjnej (DZ. U. 2004 nr 33 poz. 287 z późn. zm.). W Polsce funkcję KLR w zakresie higieny mleka, obróbki cieplnej mleka i produktów mlecznych oraz mikrobiologii mleka i produktów mlecznych, w tym *Staphylococcus aureus* i enterotoksyn gronkowcowych oraz antybiotykooporności *S. aureus*, pełni laboratorium Zakładu Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego PIWet-PIB w Puławach (Dz.U. 2014, poz. 256 z późn. zm.). Nadzór KLR nad laboratoriami

badającymi mleko i produkty mleczne polega między innymi na organizacji badań biegłości, kontroli sprzętu i odczynników używanych do badań oraz doradztwie w wyborze właściwych metod badawczych. W badaniach biegłości organizowanych przez KRL biorą udział laboratoria Zakładów Higieny Weterynaryjnej (ZHW), laboratoria zatwierdzone przez Głównego Lekarza Weterynarii oraz laboratoria znajdujące się w rejestrze GLW, wykonujące badania ogólnej liczby drobnoustrojów i liczby komórek somatycznych dla celów kontroli urzędowej. KLR, podobnie jak inne laboratoria wykonujące badania urzędowe, posiada akredytację dla wyżej wymienionych kierunków badań, która jest potwierdzeniem wiarygodności otrzymywanych wyników i zapewnia ich międzynarodową akceptację. Z kolei laboratoria z rejestru GLW, w większości laboratoria zakładowe zakładów mleczarskich, nie posiadają akredytacji dla stosowanych metod. Mimo to laboratoria te pełnią ważną rolę w zapewnieniu bezpieczeństwa i jakości produktów mlecznych, gdyż monitorują jakość surowego mleka oraz kontrolują parametry wyrobu na poszczególnych etapach procesu produkcji. Uzyskanie przez nie pozytywnego wyniku w badaniach biegłości jest potwierdzeniem kwalifikacji i kompetencji personelu laboratorium do wykonywania badań.

Celem pierwszej części prezentowanych badań była ocena występowania gronkowców koagulazo-dodatnich (CPS) w mleku krowim i kozim, charakterystyka genetyczna oraz ocena wrażliwości wyizolowanych CPS na substancje przeciwbakteryjne. Ponadto określiłam występowanie *S. aureus* i enterotoksyn gronkowcowych w serach podpuszczkowych wytwarzanych z mleka krowiego niepasteryzowanego, na różnych etapach ich produkcji. Wyniki dotyczące tej części pracy opisałam w publikacjach wymienionych w pkt. 4.1-4.4. Część druga obejmuje wyniki badań biegłości laboratoriów badawczych z zakresu higieny mleka oraz mikrobiologii mleka i produktów mlecznych, szczególnie wykrywania enterotoksyny gronkowcowej i oznaczania liczby gronkowców koagulazo-dodatnich w wybranych produktach mlecznych. Wyniki badań opisałam w publikacjach wymienionych w pkt. 4.5-4.6.

Wyniki dotyczące występowania *S. aureus* w mleku krowim przedstawiono w publikacji: Rola J.G., Korpysa-Dzirba W., Czubkowska A., Osek J.: Prevalence of enterotoxin genes and antimicrobial resistance of coagulase-positive staphylococci recovered from raw cow milk. *Journal of Dairy Science*, 2015, 98, 4273-4278 (poz. 4.1.). Badania przeprowadzono na 115 próbkach mleka surowego, które pobrano w

15 gospodarstwach bydła mlecznego i 15 mleczarniach zlokalizowanych w Polsce wschodniej. Gronkowce koagulazo-dodatnie stwierdzono w 71 (62%) próbkach mleka, spośród których 46 pochodziło z gospodarstw mlecznych, a 25 z mleczarni. Poziom zanieczyszczenia mleka bakteriami CPS wahał się od 1.0×10^0 do 1.0×10^5 jtk/ml w gospodarstwach i 1.1×10^1 do 4.5×10^3 jtk/ml w mleczarniach. Istotnym elementem omawianej pracy była także charakterystyka genetyczna oraz ocena wrażliwości wyizolowanych CPS na substancje przeciwbakteryjne. Badaniami objęto 69 izolatów z 71 wyizolowanych, które na podstawie właściwości biochemicznych i molekularnych zaliczono do gatunku *S. aureus*. Geny kodujące enterotoksyny gronkowcowe stwierdzono u 20 (29%) szczepów. Gen *sea* kodujący enterotoksynę SEA stwierdzono u jednego szczepu, gen *sec* – u dwóch szczepów, gen *sed* – u 11 szczepów, gen *ser* – u 11 szczepów, gen *seg* – u 4 szczepów, gen *seh* – u 3 szczepów, gen *sei* – u 4 szczepów, gen *sej* – u 11 szczepów i gen *sep* – u 3 szczepów *S. aureus*. Geny *sed*, *sej* i *ser* występowały u szczepów *S. aureus* razem, podobnie jak geny *seg* i *sei*. U wyizolowanych szczepów nie stwierdzono genów kodujących enterotoksyny SEB i SEE. Analiza oporności przeciwdrobnoustrojowej wykazała, że 44% szczepów wyizolowanych z mleka z gospodarstw mlecznych i 26% szczepów z mleczarni było opornych na penicylinę. Wszystkie badane izolaty *S. aureus* były natomiast wrażliwe na cyprofloksacynę, erytromycynę, gentamycynę, cefoksytynę i streptomycynę, a większość także na chloramfenikol, tetracyklinę i sulfamataksazol. Wśród badanych CPS nie stwierdzono szczepów opornych na metycylinę tzw. MRSA. Analizując potencjał enterotoksyczny wyizolowanych szczepów *S. aureus* i ich oporność na substancje przeciwbakteryjne stwierdziłam, że największą grupę (51%) stanowiły szczepy, które były wrażliwe na wszystkie użyte substancje antybakteryjne i nie posiadały genów kodujących enterotoksyny gronkowcowe. Z kolei 23% szczepów *S. aureus* było opornych na co najmniej jeden antybiotyk i posiadało jeden lub więcej genów kodujących enterotoksyny gronkowcowe. Większość z tych szczepów (56%) była oporna na penicylinę i posiadała geny *sed*, *sej* i *ser*.

Występowanie *S. aureus* w mleku kozim przedstawiono w publikacji: Rola J.G., Sosnowski M., Ostrowska M., Osek J.: Prevalence and antimicrobial resistance of coagulase-positive staphylococci isolated from raw goat milk. Small Ruminant Research 2015, 123, 124-128, (poz. 4.2). Badania przeprowadzono na próbkach mleka zbiorczego, które pobierano w okresie październik 2011 – sierpień 2013 r. w

39 fermach kozich zlokalizowanych w zachodniej i centralnej części Polski. Większość z 223 próbek mleka pobrano od kóz należących do 3 ras: polska biała uszlachetniona, saaneńska i alpejska. Gronkowce koagulazo-dodatnie stwierdzono w 192 (86.1%) próbkach mleka, pochodzących z 36 ferm kozich. Poziom zanieczyszczenia mleka koziego bakteriami CPS wahał się od 1.0×10^0 do 4.0×10^4 jtk/ml. Ogółem wyizolowano 207 szczepów, z których na podstawie testu API ID32 STAPH, 186 (89.9%) zaliczono do gatunku *S. aureus*, a 21 (10.1%) sklasyfikowano jako *Staphylococcus* spp. W dalszej części pracy oceniono oporność przeciwdrobnoustrojową izolatów *S. aureus*. Wśród badanych izolatów najwyższy odsetek stanowiły szczepy odporne na penicylinę (15.5%), następnie na sulfamataksazol (12.1%), tetracyklinę (6.3%) i cefoksytynę (6.3%). Z grupy 32 szczepów opornych na penicylinę, 14 (43.8%) szczepów było opornych także na inne substancje antybakteryjne w tym 4 (12.5%) na tetracyklinę, 3 (9.4%) na sulfamataksazol, 3 (9.4%) na streptomycynę, tetracyklinę i cefoksytynę, 2 (6.3%) na sulfamataksazol, tetracyklinę, gentamycynę, streptomycynę i cefoksytynę, 1 (3.1%) na cefoksytynę i 1 (3.1%) na cefoksytynę i sulfamataksazol. Z drugiej strony wszystkie badane izolaty *S. aureus* były wrażliwe na cyprofloksacynę, a większość (99.5%) także na chloramfenikol, trimetoprim i florfenicol. Wśród izolatów *S. aureus* wyosobnionych z mleka koziego również nie stwierdzono szczepów MRSA.

Dwie kolejne publikacje dotyczą występowania *S. aureus* i enterotoksyn gronkowcowych w serach podpuszczkowych naturalnie dojrzewających, wytwarzanych z surowego mleka krowiego. Wstępne wyniki badań opisano w publikacji: Rola J.G., Korpysa-Dzirba W., Osek J.: Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins at different stages of production of raw milk cheeses - preliminary results. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 2013, 57, 341-345, (poz. 4.3). Próbkę do omawianych badań pobrano w 2012 r., w 9 gospodarstwach położonych w północno-wschodniej Polsce. Były to małe gospodarstwa mleczne hodujące 4-6 krów, produkujące sery podpuszczkowe według tradycyjnej receptury. W każdym z gospodarstw pobierano 8-10 próbek, na różnych etapach produkcji serów. Próbkę mleka i półproduktów pobierano w dniu produkcji sera, a próbki sera gotowego do spożycia po 2 tygodniach jego dojrzewania. Łącznie badaniu poddano 82 próbki, w tym 48 próbek składających się z mleka surowego, półproduktów i gotowych serów oraz 34 próbki wymazów pobranych z środowiska produkcyjnego. Gronkowce koagulazo-dodatnie wyizolowano z 39 (81.3%) próbek

mleka i produktów mlecznych oraz z 12 (35.3%) próbek wymazów. Obecność CPS stwierdzono między innymi w próbkach mleka surowego z 4 gospodarstw, sera z 7 gospodarstw oraz w wymazach z rąk od osób wytwarzających sery z 5 gospodarstw. Maksymalny poziom zanieczyszczenia mleka surowego bakteriami CPS wynosił 10^5 jtk/ml, sera 10^7 jtk/g, a wymazów 10^4 jtk/wymaz. Wszystkie próbki zanieczyszczone CPS poddano badaniu w kierunku enterotoksyn gronkowcowych i nie stwierdzono ich obecności.

Wyniki 3-letnich badań nad występowaniem *S. aureus* i enterotoksyn gronkowcowych w wyżej wymienionych gospodarstwach produkujących sery przedstawiono w publikacji: Rola J.G., Czubkowska A., Korpysa-Dzirba W., Osek J.: Occurrence of *Staphylococcus aureus* on farms with small scale production of raw milk cheeses in Poland. *Toxins* 2016, 8, 62; doi:10.3390/toxins8030062, (poz. 4.4). W latach 2011-2013 pobrano łącznie 224 próbki, wśród których było 26 próbek mleka surowego, 90 próbek półproduktów (mleko po podgrzaniu, skrzep, ziarna serowe, uformowany ser), 26 próbek sera gotowego do spożycia oraz 102 próbki wymazów pobranych z różnych miejsc ciągu produkcyjnego. Gronkowce koagulazo-dodatnie wyizolowano z 122 (50.0%) próbek. Podobnie jak w badaniach wstępnych obecność bakterii wykryto zarówno w próbkach mleka surowego jak i produktu końcowego. Najwyższy odsetek próbek zanieczyszczonych CPS stwierdzono w próbkach sera uformowanego (80.8%), a najniższy w mleku po podgrzaniu (66.7%). Z próbek wymazów gronkowce izolowano głównie z rąk osób wytwarzających sery (42.3%).

Poziom zanieczyszczenia bakteriami CPS zależał od rodzaju analizowanej próbki. W porównaniu do badań wstępnych obecność gronkowców w mleku surowym stwierdzono w większości badanych gospodarstw. W gospodarstwach tych liczba CPS w mleku wahała się od 1×10^0 do 1×10^5 jtk/ml. Mleko pochodzące tylko z dwóch gospodarstw nie zawierało CPS. Obecność gronkowców stwierdzono we wszystkich półproduktach, a maksymalny poziom zanieczyszczenia CPS w skrzepie, ziarnach serowych i uformowanym serze wynosił odpowiednio 6.8×10^5 , 8.4×10^5 i 1.1×10^6 jtk/g. Także sery produkowane przez wszystkie badane gospodarstwa zawierały gronkowce, a liczba bakterii wahała się od 10^{-1} do 2.6×10^7 jtk/g. W próbkach pobranych od personelu i z środowiska produkcyjnego najwyższy poziom zanieczyszczenia, wynoszący 2.2×10^4 jtk/wymaz, stwierdzono w wymazach z rąk osób wytwarzających sery.

Wszystkie próbki, w których wykryto *S. aureus* poddano badaniu na obecność enterotoksyn gronkowcowych. Ich obecności nie stwierdzono w żadnej z 105 badanych próbek, włącznie z dojrzałymi serami gotowymi do konsumpcji. Jednakże geny kodujące enterotoksyny gronkowcowe wykryto u 55 (45.1%) z 122 badanych izolatów *S. aureus*. Największą grupę (27 izolatów) stanowiły szczepy zawierające kombinację 3 genów (*sed*, *sej* i *ser*), 12 izolatów miało kombinację 2 genów (*seg*, *sei*), a 15 izolatów jeden gen (*sep*). Ponadto u jednego izolatu stwierdzono gen *sea*, u trzech kombinację 3 genów (*sec*, *seg*, *sei*) i u jednego kombinację 4 genów (*sed*, *sej*, *sep* i *ser*). W dalszych badaniach ustaliłam, że z grupy 55 izolatów, które posiadały geny kodujące enterotoksyny gronkowcowe, 31 szczepów *S. aureus* posiadało zdolność do produkcji enterotoksyn. Określiłam także oporność przeciwdrobnoustrojową wyizolowanych *S. aureus*. Wśród badanych izolatów najwyższy odsetek stanowiły szczepy odporne na penicylinę (50.8%), następnie na chloramfenikol (5.7%), tetracyklinę (4.1%) i sulfamataksazol (0.8%).

Podsumowując tą część pracy wykazałam, że znaczący odsetek próbek mleka surowego pozyskanego od krów i kóz był zanieczyszczony koagulazo-dodatnimi gronkowcami. Wśród wyizolowanych *S. aureus* zidentyfikowałam szczepy, które posiadały geny kodujące enterotoksyny gronkowcowe, wśród których dominowały izolaty zawierające kombinację genów *sed*, *sej* i *ser*. Analiza oporności przeciwdrobnoustrojowej wykazała, że najwyższy odsetek stanowiły szczepy odporne na penicylinę. Stwierdziłam także szczepy odporne na chloramfenikol, co może być spowodowane występowaniem antybiotyku w środowisku lub jego nielegalnym stosowaniem w medycynie weterynaryjnej. Obecność gronkowców wykryłam także w serach produkowanych z surowego mleka krowiego oraz w wymazach z rąk osób wytwarzających sery w gospodarstwach. W przypadku niektórych gospodarstw poziom zanieczyszczenia produktu końcowego bakteriami CPS był wyższy niż dopuszczalny limit. Mimo, że wśród *S. aureus* wyizolowanych z półproduktów i dojrzałych serów zidentyfikowałam szczepy enterotoksynogenne, to w żadnej z badanych próbek nie stwierdziłam obecności enterotoksyn gronkowcowych. Wyniki moich badań wskazują, że sery podpuszczkowe produkowane w sposób tradycyjny bezpośrednio w gospodarstwach mlecznych są bezpieczne dla konsumenta. Ponieważ stosunkowo duża liczba próbek była zanieczyszczona CPS większą uwagę należy zwrócić na dobrostan zwierząt oraz higienę pozyskiwania mleka i produkcji serów dla zapewnienia bezpieczeństwa zdrowotnego produktu.

Celem dalszych badań, których wyniki przedstawiłam w opracowaniach wymienionych w pkt. 4.5-4.6, była ocena kompetencji laboratoriów badających mleko i przetwory mleczne. W badaniach biegłości przeprowadzonych w latach 1999-2004 uczestniczyło od 21 do 89 laboratoriów badawczych zajmujących się oceną mleka surowego (Rola J.G.: Badanie biegłości laboratoriów oceny mleka surowego poprzez porównania międzylaboratoryjne. *Medycyna Weterynaryjna* 2005, 61, 657-659, poz. 4.5). Próbkę do badań w postaci mleka surowego lub pasteryzowanego, przygotowane odpowiednio do kierunku badań, przekazano uczestnikom wraz z instrukcją dalszego postępowania z próbką. Badania polegały na oznaczeniu ogólnej liczby drobnoustrojów, liczby komórek somatycznych, punktu zamarzania oraz wykrywaniu antybiotyków lub innych substancji hamujących. Uzyskane wyniki poddano analizie z zastosowaniem przeznaczonych do tego typu badań testów statystycznych. W zależności od wartości wyliczonego współczynnika z-score wyniki laboratorium oceniano jako zadawalające, wątpliwe lub niezadawalające. Porównując wyniki z poszczególnych lat stwierdzono wzrost wyników zadawalających w stosunku do roku 1999, w którym badanie biegłości zorganizowano po raz pierwszy. W przypadku ogólnej liczby drobnoustrojów odsetek laboratoriów, które uzyskały wynik zadawalający metodą instrumentalną wynosił 63% w 1999 r. i 91% w 2004 r., metodą Petrifilm odpowiednio 83% i 100%, metodą płytkową 67% i 87%. Jeśli chodzi o liczbę komórek somatycznych wynik zadawalający uzyskało 56% laboratoriów w 1999 r. i 93% w 2004 r., zaś punkt zamarzania poprawnie określiło odpowiednio 53% i 91% laboratoriów. Odsetek laboratoriów, które prawidłowo oznaczyły obecność antybiotyków wynosił 83% w pierwszym roku badań i 100% w 2004 r.

Ocenę kompetencji laboratoriów w zakresie mikrobiologii mleka i produktów mlecznych w latach 2008-2012 przedstawiłam w publikacji wymienionej w pkt. 4.6 (Rola J.G., Grudka D., Osek J.: Ocena kompetencji laboratoriów poprzez badania biegłości w zakresie mikrobiologii mleka i produktów mlecznych w latach 2008-2014. *Życie Weterynaryjne* 2015, 90, 384-386). W ciągu omawianego okresu zorganizowano 12 rund badań biegłości, które obejmowały zarówno badania jakościowe - wykrywanie obecności CPS i enterotoksyn gronkowcowych, jak i ilościowe – oznaczanie liczby CPS. Uczestnikami badania biegłości były w większości ZHW oraz laboratoria zatwierdzone przez GLW do wykonywania badań dla celów kontroli urzędowych. W badaniach jakościowych dotyczących wykrywania

Staphylococcus spp. uczestniczyło 12 laboratoriów natomiast w wykrywaniu enterotoksyn gronkowcowych od 2 do 5 laboratoriów w zależności od danej rundy badań. Z kolei w oznaczeniu liczby CPS brało udział od 18 do 23 laboratoriów. Matrycą do badań był najczęściej ser twarogowy, mleko w proszku oraz mleko pasteryzowane. Produkty te fortyfikowano odpowiednią objętością wybranego rozcieńczenia hodowli bulionowej drobnoustroju/toksyny do uzyskania oczekiwanego poziomu zanieczyszczenia. Jednorodność i stabilność próbek sprawdzano zgodnie z obowiązującymi wytycznymi. Wyniki uzyskane przez uczestników badań poddano analizie statystycznej. Do oceny wyników badań ilościowych zastosowano wskaźnik z lub z' i w zależności od jego wielkości wynik laboratorium kwalifikowano jako zadawalający, wątpliwy lub niezadawalający. Wyniki badań jakościowych porównywane były z wartością przypisaną oznaczoną przez KLR, które było organizatorem badań. W badaniach jakościowych w zakresie wykrywania koagulazo-dodatnich *Staphylococcus* spp. wszystkie 12 (100%) laboratoriów uzyskały wynik pozytywny. W przypadku wykrywania enterotoksyn gronkowcowych odsetek laboratoriów, które uzyskały wynik pozytywny wynosił 95%. W okresie od 2008 do 2014 r. w 6 rundach badań z tego zakresu tylko jedno laboratorium uzyskało ocenę negatywną. Wyniki laboratoriów ZHW w zakresie wykrywania enterotoksyn gronkowcowych i *Staphylococcus* spp. były w pełni zgodne z wartością przypisaną. W badaniach ilościowych polegających na oznaczeniu liczby koagulazo-dodatnich *Staphylococcus* spp. odsetek laboratoriów z pozytywną oceną wahał się od 82% w 2008 r. do 100% w 2010 r. Również i w tych badaniach odsetek laboratoriów ZHW z wynikiem pozytywnym był wyższy niż w pozostałej grupie laboratoriów. Jako metody badawcze laboratoria stosowały przede wszystkim metody referencyjne, w przypadku gronkowców były to metoda hodowlana i metoda płytkowa, natomiast enterotoksyn gronkowcowych metoda ELFA.

Reasumując należy stwierdzić, że co raz większa liczba laboratoriów badających mleko i produkty mleczne uzyskuje wyniki pozytywne w badaniach biegłości organizowanych przez KLR. Wzrost wyników zadawalających świadczy o systematycznej pracy laboratoriów nad poprawą jakości wykonywanych badań. Wyniki te potwierdzają także wzrost kwalifikacji i kompetencji technicznych personelu laboratoriów do wykonywania badań. Było to szczególnie widoczne w przypadku laboratoriów ZHW, które stanowią ważną grupę laboratoriów wykonujących badania urzędowe. Na podstawie wieloletnich obserwacji mogę stwierdzić, że systematycznie

prorowadzone badania biegłości stanowią istotny element systemu zapewnienia bezpieczeństwa żywności i gwarantują, że uzyskiwane wyniki są rzetelne, dzięki czemu mleko i produkty mleczne w Polsce są bezpieczne dla konsumenta.

Piśmiennictwo

- André, M.C.D.P.B., Campos, M.R.H., Borges, L.J., Kipnis, A., Pimenta, F.C., Serafini, A.B., 2008. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following Smal digestion. *Food Control* 19, 200–207.
- Argudin, M.A., Mendoza, M.C., Rodicio, M.R., 2010. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins* 2, 1751–1773.
- Beuvier, E., Buchin, S., 2004. Raw milk cheeses, In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (eds.) *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp. 319-345.
- De Buyser, M.L., Dufour, B., Maire, M., Lafarge, V., 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *International Journal Food Microbiology* 67, 1-17.
- EC – European Commission, 2003. Opinion on Staphylococcal Enterotoxins in milk products, particularly cheeses (adopted on 26-27 March 2003). http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out61_en.pdf.
- EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal* 13, 3991.
- Hennekinne, J.A., De Buyser, M.L., Dragacci, S., 2012. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews* 36, 815-836.
- Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M., 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research* 2, 63–76.

- Loncarevic, S., Jørgensen, H.J., Løvseth, A., Mathisen, T., Rørvik, L.M., 2005. Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. *Journal of Applied Microbiology* 98, 344-350.
- Normanno, G., Corrente, M., La Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia, N. C., Parisi, A., Greco, G., Ballacicco, A.L., Virgilio, S., Celano, G.V., 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 117, 219-222.
- Pinchuk, I.V., Beswick, E.J., Reyes, V.E., 2010. Staphylococcal Enterotoxins. *Toxins* 2, 2177-2197.
- Rozporządzeniu Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. ustanawiające szczególne przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego. Dz.U. L 139 z 30.4.2004, s. 55.
- Rozporządzeniu Komisji (WE) NR 1441/2007 z dnia 5 grudnia 2007 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 2073/2005 w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych. Dz.U.UE.L.07.322.12
- Rozporządzenie (WE) Nr 882/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. w sprawie kontroli urzędowych przeprowadzanych w celu sprawdzenia zgodności z prawem paszowym i żywnościowym oraz regułami dotyczącymi zdrowia zwierząt i dobrostanu zwierząt, Dz.U. UE L.2004.191.1.
- Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 18 kwietnia 2012 r. w sprawie krajowych laboratoriów referencyjnych, Dz.U. 2012.480.
- Waage, S., Mørk, T., Røros, A., Aasland, D., Hunshamar, A., Odegaard, S.A., 1999. Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers. *Journal of Dairy Science* 82, 712–719.
- Williams, A.G., Withers, S.E., 2010. Microbiological characterisation of artisanal farm house cheeses manufactured in Scotland. *International Journal of Dairy Technology* 63, 356-369.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

5.1. Osiągnięcia naukowe przed uzyskaniem stopnia doktora:

W okresie tym moje zainteresowania naukowe dotyczyły występowania, charakterystyki szczepów oraz wpływu wybranych czynników fizyko-chemicznych na wzrost i przeżywalność *L. monocytogenes* w mleku i produktach mlecznych. Obecność bakterii *L. monocytogenes* stwierdziłam w 25 (5.6%) próbkach mleka surowego i w jednej (0.14%) próbce sera miękkiego spośród odpowiednio 446 i 737 próbek badanych. Wszystkie wyizolowane szczepy *L. monocytogenes* posiadały właściwości typowe dla tego gatunku. W badaniu serologicznym stwierdziłam, że szczepy te należały do serotypu 1. Wykazałam, że obniżenie temperatury inkubacji mleka z 37°C do 4°C spowodowało istotne wydłużenie czasu namnażania się wzorcowego szczepu *L. monocytogenes*. Wykazałam także, że środowisko zakwasów mleczarskich używanych do produkcji śmietany i masła działało hamująco na rozwój *L. monocytogenes*. Wyniki tych badań opisałam w pracy doktorskiej, którą obroniłam w 2002 r. w PIWet – PIB w Puławach.

5.2. Działalność naukowa po uzyskaniu stopnia doktora nauk weterynaryjnych

5.2.1. Badania nad występowaniem enterotoksyn gronkowcowych w żywności pochodzenia zwierzęcego.

Po uzyskaniu stopnia doktora zainicjowałam w zakładzie badania nad występowaniem gronkowców i enterotoksyn gronkowcowych w mleku i produktach mlecznych. Badania te prowadziłam w ramach działalności statutowej oraz programu wieloletniego pt. „Ochrona zdrowia zwierząt i zdrowia publicznego” realizowanego w latach 2009-2013 i 2014-2018. Wyniki dotychczasowych badań omówiłam szczegółowo w punkcie 4 mojego osiągnięcia naukowego. Zostały one opublikowane (pkt. 4.1, 4.2, 4.3, 4.4) i zaprezentowane w formie doniesień na konferencjach naukowych.

5.2.2. Badanie aktywności fosfatazy alkalicznej w mleku kozim i produktach mlecznych jako wskaźnika skuteczności pasteryzacji w aspekcie bezpieczeństwa zdrowotnego żywności.

Badania te prowadziłam w ramach projektu badawczego własnego, którego byłam kierownikiem, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Celem projektu była ocena skuteczności pasteryzacji mleka koziego i jego produktów poprzez

badanie poziomu aktywności fosfatazy alkalicznej (ALP). Zbadano 223 próbki przed i po przeprowadzonym procesie pasteryzacji. Aktywność enzymu wynosiła od 13 100 do 374 840 mU/l w mleku surowym i od 22 do 1 120 mU/l w mleku po obróbce cieplnej. Jakość mikrobiologiczną produktów badano w odniesieniu do ogólnej liczby drobnoustrojów, gronkowców koagulazo-dodatnich, *E. coli*, bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz obecności *Salmonella* spp. i *Listeria monocytogenes*. W mleku surowym określono liczbę *E. coli* na poziomie do $4,7 \times 10^4$ jtk/ml, bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* do $6,0 \times 10^7$ jtk/ml, gronkowców koagulazo-dodatnich do $4,0 \times 10^4$ jtk/ml. Po pasteryzacji ich liczba spadła do $<1/10^0$ jtk/ml. Ogólna liczba drobnoustrojów w mleku surowym wynosiła maksymalnie $3,6 \times 10^8$ jtk/ml, natomiast po pasteryzacji spadła do max. $2,7 \times 10^4$ jtk/ml. Nie stwierdzono obecności *Salmonella* spp. w badanych próbkach mleka, a obecność *L. monocytogenes* stwierdzono w 17 próbkach mleka surowego, zaś po pasteryzacji nie stwierdzono obecności tego drobnoustroju. Eliminacja zarówno drobnoustrojów patogennych jak i wskaźnikowych wskazuje na skuteczność przeprowadzonego procesu pasteryzacji.

W ramach badań weryfikujących skuteczność procesu pasteryzacji przemysłowej pobierano próbki produktów mlecznych z handlu detalicznego i określano ich jakość mikrobiologiczną oraz aktywność fosfatazy alkalicznej. Badania aktywności fosfatazy alkalicznej przeprowadzono dla 200 próbek mleka i 200 próbek serów. Aktywność fosfatazy alkalicznej w próbkach mleka wynosiła do 445,4 mU/l, a w próbkach serów do 342,3 mU/g. Aktywność fosfatazy alkalicznej na poziomie poniżej 350 mU/l wskazuje na właściwie przeprowadzony proces pasteryzacji. Analizy mikrobiologiczne przeprowadzono dla 100 próbek mleka oraz 105 próbek serów. W badanych próbkach nie wykryto obecności *L. monocytogenes* i *Salmonella* spp. W 23 próbkach stwierdzono obecność bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* i *E. coli*. Wyniki badań opublikowano w:

- **Rola J.G.**, Sosnowski M.: Determination of alkaline phosphatase activity in goat milk and milk products by fluorimetric method as a verification of efficacy of pasteurisation process. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 2011, 55, 705-708.
- **Rola J.G.**, Sosnowski M.: Alkaline phosphatase in cow and non-cow milk and cheese. Determination of enzyme activity as an indicator for the completeness of the pasteurisation process. AgroFood Industry Hi-Tech 2012, 23, 18-20.

- **Rola J.G.**, Sosnowski M., Osek J.: Jak wykazać skuteczność pasteryzacji mleka i produktów mlecznych. *Życie Weterynaryjne* 2012, 87, 1032-1034.

5.2.3. Ocena zagrożeń mikrobiologicznych w mleku i produktach mlecznych uzyskiwanych z surowego, termizowanego i pasteryzowanego mleka koziego.

Celem badań jest ocena jakości higienicznej mleka koziego oraz identyfikacja mikrobiologicznych zagrożeń dla zdrowia człowieka. Badania rozpoczęto w 2013 r. i dotychczas zbadano 101 różnych próbek. Próbki mleka surowego, termizowanego i pasteryzowanego oraz produkty z mleka koziego badano na obecność *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* O157, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp. i *Campylobacter* spp. W mleku surowym stwierdzono drobnoustroje patogenne należące do gatunku *L. monocytogenes* (4,8% próbek) i *Yersinia enterocolitica* (1,6%). W serach wykryto *L. monocytogenes* (3,1% próbek), a w mleku w proszku *B. cereus* (28% próbek).

5.2.4. Działalność Krajowego Laboratorium Referencyjnego Zakładu Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego PIWet-PIB w zakresie gronkowców koagulazo-dodatnich i enterotoksyn gronkowcowych, higieny mleka surowego, obróbki cieplnej mleka i produktów mlecznych oraz antybiotykooporności *S. aureus*.

Duża część mojej aktywności naukowej związana jest z nadzorem nad działalnością referencyjną realizowaną w zakresie gronkowców koagulazo-dodatnich, ich antybiotykooporności oraz enterotoksyn gronkowcowych, higieny mleka surowego oraz obróbki cieplnej mleka i produktów mlecznych. Poszczególne metody badawcze zwalidowano, a następnie wdrożono do stosowania w warunkach laboratorium. Potwierdzeniem poprawności wykonywanych badań i miarodajności uzyskiwanych wyników była pozytywna ocena, którą KRL otrzymało w badaniach biegłości organizowanych przez Laboratorium Referencyjne Unii Europejskiej (EURL). Pomyślnym zakończeniem naszych działań była pozytywna ocena Polskiego Centrum Akredytacji i przyznanie KRL certyfikatu akredytacji w omawianym zakresie badań (nr akredytacji AB 485). W ramach aktywności referencyjnej organizuję badania biegłości, seminaria na których omawiane są ich wyniki oraz szkolenia dla personelu laboratoriów urzędowych.

5.2.5. Wpływ zakażeń BHV1 i BVDV na jakość higieniczną mleka surowego.

Byłam także inicjatorką badań dotyczących wpływu zakażeń BHV1 i BVDV na jakość higieniczną mleka surowego, prowadzonych we współpracy z Zakładem Wirusologii i Spółdzielczą Mleczarnią Spomlek w Radzynie Podlaskim. Pomimo intensywnych badań nad etiologią zapaleń wymienia u krów, 20-35% wszystkich przypadków mastitis pozostaje nierozpoznanych jeśli chodzi o ich przyczynę. Według niektórych autorów przyczyną zapaleń wymienia o nieustalonej dotychczas etiologii mogą być zakażenia wirusowe. Badaniami objęto 28-29 stad bydła mlecznego z Polski Wschodniej. Status zdrowotny stad dla BHV1 określono na podstawie badania indywidualnych próbek surowicy testem ELISA IBR gB (stado nieszczepione) oraz ELISA IBR gE (stado szczepione przeciwko IBR). Oprócz surowicy testem ELISA IBR gE zbadano także próbki mleka zbiorczego, które pobrano trzykrotnie z wszystkich badanych stad bydła. Jakość mleka oceniano na podstawie liczby komórek somatycznych w mleku zbiorczym (BMSCC), ogólnej liczby drobnoustrojów, zawartości białka i tłuszczu. Na podstawie otrzymanych wyników stada podzielono na 4 grupy. Do grupy A należały stada niezakażone BHV1 i nieszczepione, do B stada niezakażone i szczepione przeciwko IBR, do C stada zakażone BHV1 z seroprewalencją <30%, a do grupy D stada zakażone BHV1 z seroprewalencją >30%. Średnia liczba BMSCC różniła się istotnie pomiędzy stadami. Najwyższą średnią liczbę BMSCC stwierdzono w stadach szczepionych przeciwko IBR (240.3×10^3 komórek/ml; grupa B), a najniższą w stadach zakażonych BHV1 z seroprewalencją <30% (197.3×10^3 komórek/ml; grupa C). Stwierdziliśmy także, że średnia liczba BMSCC była wyraźnie związana z wielkością stada tj. liczbą krów w laktacji. W stadach małych (średnio 34 krowy) liczba ta wynosiła 231.0×10^3 komórek/ml, w stadach średnich (średnio 75 krów) 198.3×10^3 komórek/ml i w stadach dużych (średnio 144 krowy) 187.5×10^3 komórek/ml. Wykazano również zależność między liczbą BMSCC, a miesiącem/sezonem pobrania mleka. Liczba BMSCC wyraźnie rosła w miesiącach letnich w porównaniu do miesięcy zimowych niezależnie od statusu stada w stosunku do BHV1. Aby zbadać czy zakażenie BHV1 może mieć wpływ na jakość mleka zastosowaliśmy mieszany model regresji liniowej, w którym liczba BMSCC była zmienną zależną. W wyniku przeprowadzonej analizy zaobserwowaliśmy dodatni związek między BMSCC a BHV1, najwyraźniej widoczny

w grupie D, w której zakażenie spowodowało wzrost liczby BMSCC o 120×10^3 komórek/ml w porównaniu do stad niezakażonych (grupa A).

Status zdrowotny stad w kierunku BVDV określono na podstawie badania próbek mleka zbiorczego testem ELISA BVDV Ab, natomiast obecność zwierząt trwale zakażonych (PI) na podstawie badania próbek surowicy testem RT-PCR. Jakość mleka oceniano na podstawie liczby BMSCC, ogólnej liczby drobnoustrojów, zawartości białka i tłuszczu. W wyniku przeprowadzonych badań 19 stad była uznano za seropozytywne, zaś zwierzęta PI stwierdzono w 4 stadach. Wykazano, że zakażenie BVDV nie miało istotnego wpływu na jakość i skład chemiczny mleka. Wartości BMSCC w stadach seroujemnych i seropozytywnych nie różniły się istotnie między sobą. Także średnie wartości BMSCC przed i po usunięciu zwierząt PI ze stada nie różniły się statystycznie istotnie. Podobnie jak w poprzednich badaniach obserwowano sezonowe zmiany BMSCC, wzrost w miesiącach letnich w porównaniu do miesięcy zimowych. Efektem tych badań były następujące publikacje:

- **Rola J.G.**, Larska M., Grzeszuk M., Bocian L., Kuta A., Polak M.P., Rola J. Bulk tank milk somatic cell counts in dairy herds with different bovine viral diarrhoea virus status in Poland. Preventive Veterinary Medicine 2014, 116, 183-187.

- **Rola J.G.**, Larska M., Grzeszuk M., Rola J.: Association between antibody status to bovine herpesvirus 1 and quality of milk in dairy herds in Poland. Journal of Dairy Science 2015, 98, 781–789.

6. Ważniejsze projekty krajowe i międzynarodowe

1. Projekt badawczy Narodowego Centrum Nauki: „Badanie aktywności fosfatazy alkalicznej w mleku kozim i produktach mlecznych jako wskaźnika skuteczności pasteryzacji w aspekcie bezpieczeństwa zdrowotnego żywności”. Projekt nr N N308 578140.
2. Projekt Celowy Zamawiany MNiSW – „Doskonalenie metod wykrywania oraz ocena zagrożeń w zakresie skażeń żywności”. Tytuł zadania: Występowanie i metody badań *Listeria monocytogenes* w żywności pochodzenia zwierzęcego. Projekt Nr PCZ- 014- 26

7. Nagrody i wyróżnienia

1. Nagroda I stopnia Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych za rok 2011, za współautorstwo pracy.
2. Nagroda II- i III-stopnia Dyrektora PIWet-PIB w konkursie na najlepszą publikację za 2011 i 2014 r.

8. Staże i szkolenia

1. Projekt Phare P9312-05-01. Quality management in the dairy sector. Olsztyn, 22-26.04.1996.
2. Implementation of the new sanitary and veterinary system (HACCP) in the production of foodstuffs of animal origin. Puławy, 14-19.04.1997.
3. Projekt Phare PL 9704-01-12. Auditowanie systemu HACCP dla inspektorów Państwowej Inspekcji Weterynaryjnej. Puławy, 17-21.07.2000.
4. Ecole Nationale des Services Vétérinaires, Lyon, France. Aspects scientifiques du recours à l'analyse de laboratoire dans le cadre des contrôles en hygiène des aliments. 27.11-01.12. 2000.
5. Ecole Nationale des Services Vétérinaires, Lyon, France. Recours à l'analyse de laboratoire lors des contrôles en hygiène des aliments, aspects opérationnels. 22-26.01.2001.
6. Ecole Nationale des Services Vétérinaires, Lyon, France. Organisation, fonctionnement d'un laboratoire d'analyse vétérinaire – accréditation, assurance de la qualité. 19-23.02.2001.
7. Agence Francaise de Securite Sanitaire des Aliments (AFSSA). Detection of staphylococcal enterotoxins and dairy microbiology. Maisons-Alfort, Francja 15-17.11.2004.
8. V workshop on rapid methods and automation in food microbiology. Barcelona, Hiszpania, 21-24.11.2006.
9. Austrian Agency for Health and Food Safety. 11th Workshop of the EU CRL for milk and milk products (MMP) dedicated to alkaline phosphatase. Wiedeń, Austria, 9-10.10.2008.
10. Agence Francaise de Securite Sanitaire des Aliments (AFSSA). Determination of alkaline phosphatase activity in cheese using ISO 11816-2:2003. Maisons-Alfort, Francja, 27.05.2009.

9. Udział w zespołach eksperckich i konkursowych

1. Jestem członkiem grupy roboczej: WG on harmonization of conversion factors in Milk. EURL for : Milk and Milk Products, ANSES, Maisons-Alfort, France.
2. Jestem członkiem grupy roboczej: WG dedicated to the standardization of the detection method of staphylococcal enterotoxins in food matrices, EURL for Coagulase Positive Staphylococci, ANSES, Maisons-Alfort, France. (CEN/TC 275/WG 6 Mandate M/381).
3. Jestem audytorem technicznym laboratoriów badawczych Polskiego Centrum Akredytacji.
4. Uczestniczę w pracach/jestem reprezentantem członka (PIWet-PIB w Puławach) Komitetu Technicznego 35 ds. Mleka i Przetworów Mlecznych Polskiego Komitetu Normalizacyjnego (PKN).

10. Udział w konferencjach międzynarodowych i krajowych

1. TAIEX Workshop „Inter-laboratory testing with regard to hygiene of milk and milk products.” Maisons – Alfort, France 13 – 14.10.2003
2. XII Kongres PTNW Nauka Praktyce, Warszawa 2004
3. V Sesja Przeglądowa Analityki Żywności, Warszawa, 2004,
4. Hygiena Alimentorum XXV, Strbskie Pleso, Slovakia, 2004
5. III International Conference Protection Against Bioterrorism, Kazimierz Dolny 2005
6. Sympozjum Naukowe „Zoonozy – Aktualne zagrożenia”. Warszawa 24 – 25.03.2006
7. VI Sesja Przeglądowa Analityki Żywności, Warszawa 17 listopada 2006.
8. Hygiena Alimentorum XXVIII „ Safety and quality of milk and milk products, Strbskie Pleso, Słowacja 02 – 04.05.2007
9. XXVI Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, Szczecin 18 – 20 września 2008
10. XIII Kongres PTNW „Od nauki do praktyki”, Olsztyn, 18 – 20 września 2008
11. I Kongres Nauk Rolniczych Nauka - Praktyce, Puławy 14 – 15.05.2009
12. XXXIX Sesja Komitetu Nauk o Żywności Polskiej Akademii Nauk, Poznań 29.06 – 01.07.2009
13. 4th International Conference on Quality and Safety in Food Production Chain, Wrocław, 24 – 25 September 2009.
14. Hygiena Alimentorum XXXI „Safety and Quality of milk”, Strbskie Pleso, Słowacja, 5 – 7.05.2010
15. 9th International Meeting on Microbial Epidemiological Markers, Wernigerode, Niemcy, 1 – 4.09.2010

16. 5 th Workshop of the National Reference Laboratories for coagulase positive staphylococci”, Maisons – Alfort, France, 16–17.06.2011
17. 4 th Congress of European Microbiologists Geneva, Switzerland, June 26 – 30.2011
18. 5 th International Conference on the „Quality and safety in food production chain”. Wrocław, Polska 19 – 20.09.2011
19. XXVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, Lublin, 5-8.09.2012
20. XIV Kongres PTNW, Wrocław, 13-15.09.2012.
21. 23rd International ICFMH Symposium FoodNicro 2012, Stambuł, Turcja 03-07.09.2012.
22. Regional IGA Conference on Goat Milk Quality, Tromsø, Norwegia 4-6.06.2013.
23. International Conference on Food Science and Nutrition, Londyn, Wielka Brytania 8-9.07.2013.
24. Międzynarodowa Konferencja - „Analiza Ryzyka w Bezpieczeństwie Żywności – 50 lat Kodeksu Żywnościowego w regionie Europy”, Puławy 19-20.09.2013.
25. 8 th Workshop Proficiency testing in analytical chemistry, microbiology and laboratory medicine. Berlin, Niemcy, 6-9.10.2014.
26. 6th Internal Conference on the „Quality and safety in food production chain, Wrocław 26-27.06.2014.
27. SfAM Summer Conference 2014. Zoonoses: One health, one medicine. Brighton, UK, 1-2.07.2014.
28. Current approaches to health and diseases in animals and humans, Lublin 19-20.09.2014.
29. 17 th Workshop of the EURL/NRLs for Milk and Milk Products. Maisons - Alfort, France, 1-3.10.2014.

Szczegółowy wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacje o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki znajdują się w załączniku 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

J. G. Rda

