

Załącznik nr 2 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

Monika Szymańska-Czerwińska  
Zakład Chorób Bydła i Owiec  
Państwowy Instytut Weterynaryjny  
Państwowy Instytut Badawczy

## **Autoreferat**

**„Badania nad występowaniem *C. burnetii* u ludzi i zwierząt  
z uwzględnieniem oceny potencjału diagnostycznego  
zastosowanych metod badawczych”**

**Puławy 2016**

## Spis treści

1	Życiorys naukowy .....	1
1.1	Wykształcenie .....	1
1.2	Doświadczenie zawodowe (informacje o zatrudnieniu w tym w jednostkach naukowych) .....	1
2	Przebieg pracy naukowo-badawczej .....	1
2.1	Praca magisterska.....	1
3	Osiągnięcie wynikające z art. 16 rozdz. 2 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311).....	4
3.1	Szymańska-Czerwińska M., Niemczuk K., Mitura A.: Prevalence of <i>Coxiella burnetii</i> in dairy herd - diagnostic methods and risk to humans – a review. Bull Vet Inst Pulawy 2014, 58, 337-340.....	5
3.2	Szymańska-Czerwińska M., Galińska E.M., Niemczuk K., Knap J.P.: Prevalence of <i>Coxiella burnetii</i> infection in humans occupationally exposed to animals in Poland. Vector Borne and Zoonotic Diseases 2015, 15, 4, 261-267.....	5
3.3	Szymańska-Czerwińska M., Galińska M.E., Niemczuk K., Zasepa M. Prevalence of <i>Coxiella burnetii</i> infection in foresters and ticks in South-Eastern Poland and comparison diagnostic methods. Ann Agric Environ Med 2013, 20, 699-704. ....	5
3.4	Niemczuk K., Szymańska-Czerwińska M., Zarzecka A., Konarska H.: Q fever in a cattle herd and humans in the South-Eastern Poland. Laboratory diagnosis of the diseases using serological and molecular methods. Bull Vet Inst Pulawy 2011, 55, 593-598.....	5
3.5	Jodełko A., Niemczuk K., Szymańska-Czerwińska M. Seroprevalence of <i>Coxiella burnetii</i> in Polish cattle herds. Bull Vet Inst Pulawy 2015, 59, 479-482. ....	6
3.6	Szymańska-Czerwińska M., Niemczuk K., Jodełko A. Evaluation of qPCR and phase I and II antibodies for detection of <i>Coxiella burnetii</i> infection in cattle. Research in Veterinary Science 2016, 108, 68-67. ....	6
3.7	Wstęp.....	6
3.8	Cel pracy .....	7
3.9	Omówienie przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników.....	8
3.10	Podsumowanie .....	10
3.11	Wnioski .....	10
4.	Ważniejsze osiągnięcia w zakresie badań prowadzonych poza zgłaszanym cyklem tematycznym .....	11
4.1.	Chlamydioza .....	11
4.2.	Mykoplazmoza bydła .....	12
4.3.	Borelioza i kamylobakterioza.....	13

4.4.	Badanie wpływu toksyny <i>Mannheimia haemolytica</i> , PI3V i BRS, i <i>M. bovis</i> na stan układu immunologicznego cieląt.....	13
5.	Piśmiennictwo związane z tematyką badań .....	13
6.	Podsumowanie dorobku naukowego.....	15

## 1 Życiorys naukowy

### Monika Szymańska-Czerwińska

Zakład Chorób Bydła i Owiec/Laboratorium Diagnostyki Serologicznej  
Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy  
Al. Partyzantów 57  
24-100 Puławy  
tel.81 88932 71  
email: monika.szymanska@piwet.pulawy.pl

### 1.1 Wykształcenie

rok	wykształcenie
1999-2004	studia magisterskie wydział Farmaceutyczny, Oddział Analityki Medycznej Akademii Medycznej w Lublinie – <b>tytuł magistra analityki medycznej</b> Tytuł rozprawy magisterskiej „Poszukiwanie mutacji punktowych w genie pRB w raku endometrium” - promotor prof. dr hab. Jacek Wojcierowski
2010	<b>tytuł doktora nauk weterynaryjnych</b> nadany Uchwałą Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach z dnia 08-12-2010 Tytuł rozprawy doktorskiej „Wpływ stosowanych w paszach prebiotyków i tylozyny na wybrane parametry immunologiczne i produkcyjne cieląt, - promotor prof. dr hab. Dariusz Bednarek, recenzenci: prof. dr hab. Anna Winnicka oraz prof. dr hab. Krzysztof Kwiatek. (zał. nr 1)

### 1.2 Doświadczenie zawodowe (informacje o zatrudnieniu w tym w jednostkach naukowych)

rok	doświadczenie zawodowe
2005-2007	<b>specjalista inżynierjno - techniczny</b> w Zakładzie Chorób Bydła i Owiec, Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy (PIWet-PIB) w Puławach
2007-2011	<b>asystent</b> w Zakładzie Chorób Bydła i Owiec, PIWet-PIB
od 2011 - obecnie	<b>adiunkt/ kierownik ds. jakości</b> w Zakładzie Chorób Bydła i Owiec, PIWet-PIB
od 2011 - obecnie	<b>kierownik/ kierownik ds. jakości</b> Laboratorium Diagnostyki Serologicznej, PIWet-PIB
od 2013 - obecnie	<b>ekspert</b> Polskiego Centrum Akredytacji
od 2013- obecnie	<b>wykładowca</b> w Centrum Edukacji CE2 w Lublinie

## 2 Przebieg pracy naukowo-badawczej

### 2.1 Praca magisterska

W trakcie studiów na Wydziale Farmaceutycznym, Oddział Analityki Medycznej w Lublinie oprócz uczestnictwa w obowiązkowych zajęciach dydaktycznych zaangażowana była w działalność naukowo-badawczą min. poprzez uczestnictwo w Kole Naukowym Toksykologicznym prowadzonym w Katedrze i Wydziale Toksykologii pod kierownictwem Pani

prof. dr hab. n. farm. Ewa Jagiełło-Wójtowicz. W tym czasie brałam czynny udział w wykonywaniu badań eksperymentalnych na zwierzętach laboratoryjnych min. w zakresie badania skuteczności preparatów przeciwbólowych. Jednocześnie w obszarze moich zainteresowań były nowoczesne metody laboratoryjne min. PCR. Dlatego też pracę magisterską pt „Poszukiwanie mutacji punktowych w genie pRB w raku endometrium” wykonywałam w Zakładzie Genetyki Medycznej, której promotorem był prof. dr hab. Jacek Wojcierowski. Badania dotyczyły częstości występowania zaburzeń w genie pRB z uwzględnieniem występowania utraty heterozygotyczności (LOH) w intronach 4, 17 i 20 tego genu u kobiet z rakiem endometrium. Ponadto, w badaniach uwzględniona została ocena korelacji pomiędzy wystąpieniem mutacji w genie pRB oraz wiekiem pacjentek i kliniczno-histopatologicznymi wykładnikami zaawansowania raka endometrium. Przeprowadzone przez mnie badania wykazały, że LOH występuje w niewielkim odsetku analizowanych przypadków. W związku z czym można zakładać, że zmiany w genie pRB mogą być powodowane przez inny mechanizm inaktywacji niż LOH np. poprzez zmiany na poziomie transkrypcji i translacji. Badania przeprowadzone przez mnie wykazały, że LOH w genie pRB występuje we wczesnym stadium klinicznym, co dowiodło, że utrata heterozygotyczności ma miejsce przed klonalną ekspansją guza. Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała, że brak jest korelacji pomiędzy wiekiem pacjentek, a mutacją w obrębie genu pRB. Badania stanowiły cenny wkład w rozwój wiedzy w zakresie mechanizmów powstawania nowotworów oraz sposobów ich zapobiegania poprzez stosowanie terapii genowej. Uzyskane wyniki badań zostały przedstawione w pracy magisterskiej, którą obroniłam w czerwcu 2004r. z wynikiem bardzo dobrym.

## **2.2. Pierwszy etap pracy naukowo-badawczej w PIWet-PIB – substancje czynne w paszach leczniczych**

Zdobyte doświadczenie w trakcie toku studiów umożliwiły mi podjęcie w 2005r. pracy na stanowisku specjalisty inżynierijno-technicznego w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym - Państwowym Instytucie Badawczym w Puławach w Zakładzie Chorób Bydła i Owiec. Wówczas to powierzono mi opracowanie i wdrożenie metody mikrobiologicznej – płytkowej do wykrywania i oznaczania substancji czynnych w paszach leczniczych min. tylozyny, tiamuliny, linkomycyny, chlorotetracykliny. W tym okresie odbyłam dwu tygodniowy staż w RIKILT Institute, Wageningen, Holandia, gdzie doskonaliłam swoje umiejętności praktyczne oraz wiedzę teoretyczną w zakresie wykrywania substancji niedozwolonych w paszach oraz oznaczania poziomu substancji czynnych w paszach leczniczych przy zastosowaniu, zarówno technik mikrobiologicznych, jak i chemicznych min. wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Ten etap mojej działalności badawczo-technicznej zakończony został opracowaniem i wdrożeniem do stosowania przez Laboratoria Inspekcji Weterynaryjnej 6 instrukcji dotyczących oznaczania poziomu antybiotyków w paszach leczniczych (zał. nr 3 pkt. III M poz. 1–6). Ponadto, z tego obszaru aktywności powstała publikacja (zał. nr 3 pkt. II A1 poz. 2, 3).

## **2.3. Praca doktorska**

Jednocześnie zaangażowana była w prace badawczo-eksperymentalne związane z odpowiedzią immunologiczną, zarówno typu komórkowego, jak i humoralnego u bydła żywionego paszą z dodatkami antybiotykowych stymulatorów wzrostu (ASW) oraz substancjami dla nich alternatywnymi min. prebiotykami. Badania w tym zakresie stały się przedmiotem mojej rozprawy doktorskiej pt „Wpływ stosowanych w paszach prebiotyków i tylozyny na wybrane parametry immunologiczne i produkcyjne cieląt”. Tematyka prowadzonych badań była wówczas bardzo istotna z punktu widzenia wymagań prawnych związanych z wprowadzeniem w 2006r. zakazu stosowania ASW w żywieniu zwierząt hodowlanych, co spowodowało, że zarówno hodowcy, jak i świat nauki zaczął poszukiwać rozwiązań alternatywnych, które mogły by zastąpić dotychczas stosowane ASW. Realizacja przewodu doktorskiego wymagała przede wszystkim opanowania warsztatu laboratoryjnego, który obejmował min. badania:

cytometryczne związane z fenotypowaniem subpopulacji leukocytów krwi obwodowej, hematologiczne, biochemiczne (kolorymetryczne, spektrofotometryczne), mikrobiologiczne, immunoenzymatyczne oraz aktywności mikroflory żywca u bydła. Uzyskane wyniki badań dowiodły, że zastosowanie prebiotyku, jako alternatywy dla ASW działa stymulująco na układ immunologiczny bydła oraz ma pozytywny wpływ na liczbę poszczególnych subpopulacji leukocytów oraz aktywność fagocytarną komórek. Uzyskane wyniki badań wykazały istotny wzrost ogólnej liczby leukocytów we krwi cieląt otrzymujących prebiotyki wraz z odsetkiem niektórych subpopulacji tych komórek, w tym PMNL (polymorphonuclear leucocyte), a zwłaszcza limfocytów i komórek średniej wielkości (MID). Stymulujący wpływ na te wskaźniki odnotowano również w grupie zwierząt żywionych tylozyną. Istotny wpływ ASW, jako prebiotyku obserwowano również w odniesieniu do takich parametrów jak: RBC, HCT, HGB i PLT. Natomiast wyłącznie u cieląt otrzymujących prebiotyki zdecydowanie wyższe wartości odnotowano w zakresie populacji limfocytów CD2<sup>+</sup> (limfocyty T) wraz z ich subpopulacjami CD4<sup>+</sup> (limfocyty pomocnicze), CD8<sup>+</sup> (limfocyty cytotoksyczne/supresorowe), WC4<sup>+</sup> (limfocyty B) oraz komórki CD14<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> (monocyty). Przedmiotem moich badań był również wpływ tylozyny i prebiotyku na aktywność fagocytarną polimorfonuklearnych leukocytów (PMNL) i monocytów poprzez ocenę takich parametrów jak: indeks fagocytarny, odsetek komórek fagocytujących, NBT - dodatnich oraz zdolność migracji neutrofilii. Ponadto, oceniałam też wpływ tych substancji na stan odporności humoralnej poprzez ocenę stężenia i aktywności wybranych cytokin (IL-1, IL-2, INF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ), stężenie białka całkowitego i gamma globulin oraz miano konglutyniny i aktywności fosfatazy alkalicznej (ALP). W badaniach uwzględniłam również wpływ prebiotyku i tylozyny na stan funkcjonalny żywca poprzez: oznaczanie liczby bakterii i pierwotniaków, pH, stężenie lotnych kwasów tłuszczowych, czas fermentacji: glukozy, trawienia celulozy, redukcji azotynów, a także test oksydoredukcyjny. Przeprowadzone doświadczenie wykazało, że podawanie prebiotyku, jak również tylozyny będącej ASW, powodowało istotne zwiększenie liczby erytrocytów i trombocytów oraz stężenia hemoglobiny i wartości hematokrytowej (HCT). Badania potwierdziły, że prebiotyki zwiększały liczbę leukocytów, poprzez podwyższenie ogólnej liczby limfocytów oraz monocytów. Ponadto, wykazałam zwiększoną liczbę limfocytów T oraz ich subpopulacji CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>, a także limfocytów B (WC4<sup>+</sup>). Przeprowadzone badanie eksperymentalne wykazało, że zarówno tylozyna, jak i ASW pobudzają aktywność fagocytarną komórek oraz działają stymulująco na wydzielanie cytokin min. IL-1, IL-2, TNF-  $\alpha$  oraz IFN- $\alpha$ . Jednakże prebiotyki w odróżnieniu od tylozyny działały korzystniej na przebieg procesów fermentacyjnych żywca poprzez stymulujący wpływ na rozwój jego mikroflory, a w konsekwencji poprawiały przemianę glukozy, rozkład celulozy i redukcję azotynów oraz zwiększały stężenie lotnych kwasów tłuszczowych i jonów wodorowych w płynnej treści żywca. Ponadto, prebiotyki korzystniej niż tylozyna wpływały na procesy odpornościowe cieląt, zarówno komórkowe jak i humoralne, a ogólna ich zdrowotność i produktywność w zakresie tempa (GR) i wielkości przyrostów masy ciała były do siebie zbliżone, ze zwiększonym jednak znacznie współczynnikiem wykorzystania paszy (FCR) u zwierząt otrzymujących tylozynę. Przeprowadzone badania stanowiły istotny wkład w poszukiwanie zamienników dla wycofanych ASW i potwierdziły, że prebiotyki mogą stanowić obiecującą dla nich alternatywę.

Wyniki badań zostały opublikowane jako cykl czterech publikacji w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym (załącznik nr 3 pkt. II A1. poz. 1, 3, 6 oraz pkt. II A2. poz. 3–6), których jestem głównym autorem. Jedna z publikacji pkt. II A1 poz. nr 6 została nagrodzona nagrodą I stopnia Dyrektora Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach w kategorii prac eksperymentalnych w roku 2009.

## 2.4 Drugi etap działań badawczo-technicznych w PIWet-PIB – choroby zakaźne zwierząt

Równolegle zaangażowana byłam w działalność związaną z funkcjonowaniem Krajowego Laboratorium Referencyjnego w zakresie chlamydiozy, gorączki Q oraz kamylobakteriozy, a od 2013r. również boreliozy psów, co wiązało się ze wdrażaniem nowoczesnych metod laboratoryjnych (PCR, real-time PCR, nested PCR, multilocus sequence typing (MST), Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA), sekwencjonowanie) do diagnostyki ww. chorób zakaźnych zwierząt. Aktywnie uczestniczyłam w procesie wdrażania zarówno metod serologicznych, mikrobiologicznych, jak i molekularnych. Działania te dotyczyły głównie opracowywania, walidowania i wdrażania procedur badawczych, które z czasem uzyskały statut metod akredytowanych. Początkowo jako zastępca, a następnie kierownik ds. jakości uczestniczyłam w tworzeniu i wdrażaniu systemu zarządzania zgodnego z normą PN-EN ISO/IEC 17025:2005, zarówno na poziomie Zakładu, jak i Instytutu. Zdobyte doświadczenie w zakresie działań technicznych związanych z wykonywaniem i nadzorowaniem badań oraz tworzeniem systemu zarządzania w laboratorium umożliwiło mi podjęcie pracy w charakterze eksperta Polskiego Centrum Akredytacji.

Swoją wiedzę zarówno praktyczną, jak i teoretyczną w zakresie diagnostyki i epidemiologii chorób zakaźnych pogłębiałam poprzez uczestnictwo w stażach/szkoleniach w zagranicznych Laboratoriach Referencyjnych oraz udział w konferencjach i warsztatach naukowych (patrz zał. nr 3 pkt. III B i L). Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że nadzorowane przez mnie działania techniczne i naukowe prowadzone w ramach Laboratorium Referencyjnego w zakresie gorączki Q doprowadziły do uzyskania w 2016r. przez Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy w Puławach statusu Laboratorium Referencyjnego Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (OIE).

Od sierpnia 2011 roku zostałam kierownikiem Laboratorium Diagnostyki Serologicznej, w którym prowadzone są badania serologiczne w zakresie serologicznej diagnostyki chorób zakaźnych zwierząt takich jak białaczka bydła, bruceloza, chlamydioza, gorączka Q, zaraza stadnicza koni, klasyczny pomór świń, choroba Aujeszkiego, mykoplazmoza oraz pomór drobiu. Jednocześnie pełnię funkcje kierownika ds. jakości w tym laboratorium.

Aktywność w zakresie chorób zakaźnych zwierząt została szczegółowo przedstawiona w pkt. 4.

Wynik badań w zakresie ww. chorób zakaźnych zostały opublikowane (załącznik nr 3 pkt. II A2. poz. 1–2, 7-17).

### 3 Osiągnięcie wynikające z art. 16 rozdz. 2 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311)

Osiągnięcie stanowi jednotematyczny cykl publikacji pod wspólnym tytułem:

#### **„Badania nad występowaniem *C. burnetii* u ludzi i zwierząt z uwzględnieniem oceny potencjału diagnostycznego zastosowanych metod diagnostycznych”**

Oświadczam, że w przedstawionych publikacjach opisane zostały wyniki badań i w każdej z nich aktywnie uczestniczyłam w koncepcji tych badań. We wszystkich publikacjach byłam autorem lub współautorem tekstu i/lub autorem korespondencyjnym oraz współwykonawcą badań. Przedstawione publikacje podlegały rygorystycznym recenzjom w celu spełnienia szczegółowych wymagań stawianych. Swój udział w powstaniu i opublikowanie przedstawionych prac oceniam na 70-80%. Oświadczenia współautorów prac zostały załączone (załącznik nr 4).

- 3.1 Szymańska-Czerwińska M., Niemczuk K., Mitura A.: Prevalence of *Coxiella burnetii* in dairy herd - diagnostic methods and risk to humans – a review. Bull Vet Inst Pulawy 2014, 58, 337-340.**

IF=0,357, liczba punktów MNiSW =15, liczba cytowań =1

*Wkład własny: gromadzenie danych, przygotowanie manuskryptu i opracowaniu koncepcja publikacji. Mój udział w powstaniu publikacji oceniam na 80%.*

- 3.2 Szymańska-Czerwińska M., Galińska E.M., Niemczuk K., Knap J.P.: Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in humans occupationally exposed to animals in Poland. Vector Borne and Zoonotic Diseases 2015, 15, 4, 261-267.**

IF=1,956, liczba punktów MNiSW = 25, liczba cytowań =2

*Wkład własny: współudział w wykonywaniu badań laboratoryjnych, interpretacja wyników badań, koncepcja badań i publikacji oraz pisanie manuskryptu. Mój udział w powstaniu publikacji oceniam na 80%.*

- 3.3 Szymańska-Czerwińska M., Galińska M.E., Niemczuk K., Zasępa M. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in foresters and ticks in South-Eastern Poland and comparison diagnostic methods. Ann Agric Environ Med 2013, 20, 699-704.**

IF=3,06 (w momencie opublikowania\*), liczba punktów MNiSW = 30 (w momencie opublikowania), liczba cytowań=6

*\*wyjaśnienie: po kilku miesiąca od publikacji czasopismo straciło impact factor poprzez co aktualnie w bazie Web of Science impact factor czasopismo za rok 2013 nie ma IF.*

*Wkład własny: wykonywanie badań laboratoryjnych, interpretacja wyników badań, koncepcja badań i publikacji oraz opracowanie manuskryptu. Mój procentowy udział w powstaniu publikacji oceniam na 80%.*

*Publikacja nagrodzona nagrodą III stopnia w kategorii prac oryginalnych przez Dyrektora Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach w roku 2014.*

- 3.4 Niemczuk K., Szymańska-Czerwińska M., Zarzecka A., Konarska H.: Q fever in a cattle herd and humans in the South-Eastern Poland. Laboratory diagnosis of the diseases using serological and molecular methods. Bull Vet Inst Pulawy 2011, 55, 593-598.**

IF=0,414, liczba punktów MNiSW =20, liczba cytowań=6

*Wkład własny: zgromadzenie materiału do badań, wykonywanie badań laboratoryjnych, współudział w interpretacji wyników badań, koncepcji badań i publikacji oraz pisanie manuskryptu. Mój procentowy udział w powstaniu publikacji oceniam na 70%.*



**3.5. Jodelko A., Niemczuk K., Szymańska-Czerwińska M. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in Polish cattle herds. Bull Vet Inst Pulawy 2015, 59, 479-482.**

IF=0,468, liczba punktów MNiSW = 15, liczba cytowań=0

*Wkład własny: Udział w wykonywaniu badań, interpretacji wyników, koncepcji badań i publikacji oraz przygotowaniu manuskryptu. Mój udział w powstaniu publikacji oceniam na 70%.*

**3.6. Szymańska-Czerwińska M., Niemczuk K., Jodelko A. Evaluation of qPCR and phase I and II antibodies for detection of *Coxiella burnetii* infection in cattle. Research in Veterinary Science 2016, 108, 68-67.**

IF =1,50, liczba punktów MNiSW = 35, liczba cytowań=0

*Wkład własny: udział w wykonywaniu badań, analiza i interpretacja wyników badań, koncepcja badań i publikacji oraz przygotowanie manuskryptu do publikacji. Mój udział w powstaniu publikacji oceniam na 70%.*

Sumaryczny impact factor publikacji stanowiących dzieło podlegające ocenie wynosi 8,759, a liczba punktów MNiSW wynosi 140.

### **3.7. Wstęp**

Gorączka Q jest chorobą zakaźną występującą zarówno u zwierząt, jak i u ludzi na całym świecie (2, 6, 14). Głównym rezerwuarem drobnoustroju są bydło i małe przeżuwacze, notowane są również przypadki nosicielstwa wśród ptaków, gryzoni i gadów oraz zwierząt towarzyszących człowiekowi. Rolę wektora pełnią kleszcze (11, 15). Czynnikiem etiologicznym gorączki Q jest *Coxiella burnetii*, która zaliczana jest do rzędu Legionellales, rodziny Coxiellaceae. Jest to drobnoustrój, który cechuje się pleomorficznością oraz zmiennością fazową. Występuje w postaci trzech form morfologicznych: LCV (large cell variants), SCV (small cell variants) oraz SDC (small dense cells). Zmienność fazowa polega na występowaniu komórek bakteryjnych w dwóch odmianach antygenowych. Antygeny fazy I występują w warunkach naturalnych oraz po zakażeniu eksperymentalnym, natomiast podczas pasażu przez woreczek żółtkowy zarodka kurzego lub hodowlę komórkową dochodzi do utraty antygenów powierzchniowych i wówczas ujawniają się antygeny specyficzne dla fazy II. *C. burnetii* to drobnoustrój bardzo odporny na działanie czynników środowiskowych, cechuje się dużą przeżywalnością w środowisku, dlatego zwalczanie infekcji w stadzie jest bardzo trudne i bardzo często nieskuteczne. Dodatkowo eliminację patogenu utrudnia jego wewnątrzkomórkowy cykl rozwojowy (3). Natomiast dostępna szczepionka dla zwierząt nie eliminuje zakażenia, a jedynie obniża poziom siewstwa.

Jak wynika z najnowszych danych literaturowych gorączka Q stanowi istotny problem zdrowotny ludzi i zwierząt. U zwierząt choroba może mieć postać ostrą, która z czasem przechodzi w formę przewlekłą (3). Wówczas bardzo często zdarza się, że objawy kliniczne w stadzie nie są obserwowane, a infekcja szerzy się poprzez bezobjawowych siewców patogenu. Może występować nieznaczne podwyższenie ciepłoty wewnętrznej ciała, które utrzymuje się przez kilka dni, a z czasem mogą wystąpić stany zapalne stawów, *mastitis* lub zapalenie płuc oraz poronienia lub problemy z rozrodem, a w łożysku zainfekowanej krowy zaobserwować można obrzęki oraz lokalne wylewy krwawe. Ponadto, mogą się pojawić stany zapalne gałek ocznych, a także zwiększona ilość płynu surowiczego-śluzowego wypływającego z worka spojówkowego i nosa. Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku infekcji u ludzi, objawy również są niespecyficzne, a wręcz grypopodobne, co powoduje, że najczęściej przypadki zachorowań nie są właściwie diagnozowane i rejestrowane. Nie leczona

infekcja u ludzi może przybrać formę przewlekłą i powodować zapalenie mięśnia sercowego (8). Przypadki zachorowań u ludzi najczęściej stwierdzane są równoległe z ogniskami choroby u zwierząt. Do zakażenia u ludzi dochodzi najczęściej drogą oddechową poprzez wdychanie unoszących się z pyłem bakterii. *Coxiella burnetii* w pyłe zawierającym zainfekowany kał może być przenoszona przez wiatr na odległość kilkunastu kilometrów. Inną drogą transmisji jest kontakt bezpośredni z zakażonym zwierzęciem np. w czasie udzielania pomocy przy porodzie, dojenia, obróbce mięsa czy też strzyży owiec. Niewykluczona jest też możliwość przeniesienia patogenu drogą alimentarną, poprzez spożywanie surowego mleka od zakażonych zwierząt lub produktów wytworzonych na bazie mleka niepasteryzowanego (18). Doskonałym przykładem zagrożenia jakie stanowi ten czynnik zoonotyczny jest epidemia, która miała miejsce w Holandii w latach 2007–2010. Źródłem infekcji były wówczas małe przeżuwacze, głównie kozy, oprócz licznych ognisk choroby u zwierząt odnotowano wówczas ponad 4 tys. przypadków zachorowań u ludzi. Była to największa jak do tej pory epidemia gorączki Q w Europie (13). Wcześniej za największą uważano tą odnotowaną w 1982 r. w Polsce wschodniej (Ułhówek, powiat hrubieszowski), wówczas potwierdzono infekcję u ponad 1000 osób, a źródłem zakażenia było bydło (7). Wyniki badań filogenetycznych wskazują, że znacznie częściej przyczyną zachorowań u ludzi są szczepy izolowane od małych przeżuwaczy niż od bydła. Jednakże stwierdzane są też przypadki infekcji powodowanych przez szczepy izolowane również od bydła. Najnowsze wyniki badań uzyskane przez mnie (jeszcze nie opublikowane) wskazują, że w Polsce w populacji bydła mlecznego obecny jest genotyp ST20, który izolowany był wcześniej również z zastawek serca u ludzi np. we Francji.

Wyniki badań prowadzone w ostatnich latach w różnych państwach europejskich, wskazują na znaczny wzrost poziomu seroprewalencji w stadach bydła. Dla przykładu seroprewalencja w Danii i Holandii wynosi 79% (1, 10), Republice Irlandii 38% (12), północnej Irlandii (65%) (9), północnej Hiszpanii 67% (4), Belgii w regionie Walonii 71% (5). Należy podkreślić, że ogniska choroby bardzo często stwierdzane są również u bydła mlecznego, co stanowi szczególnie istotny problem w aspekcie zagrożenia dla zdrowia publicznego. Nie mniej jednak dane na temat występowania tej choroby, zarówno u zwierząt jak i u ludzi, są niedoszacowane, ponieważ w wielu krajach nie są prowadzone. Należy podkreślić, że Polska jest jedynym państwem europejskim w którym gorączka Q włączona jest do badań monitoringowych w zakresie chorób zakaźnych zwierząt. Obszar Polski południowo-wschodniej uważany jest za obszar endemicznego występowania gorączki Q (7).

Diagnostyka gorączki Q na podstawie objawów klinicznych jest niemożliwa, ponieważ nie są one patognomoniczne, dlatego też bardzo ważne jest zastosowanie właściwych narzędzi diagnostycznych oraz prawidłowa interpretacja wyników. Diagnostyka laboratoryjna zarówno u zwierząt jak i ludzi nie jest łatwa. Wprowadzenie w Polsce 2013 roku do obrotu szczepionki, która nie jest preparatem typu DIVA spowodowało trudności w diagnostyce serologicznej. Dlatego diagnostyka serologiczna w stadach już zaszczepionych jest niemożliwa i może być wówczas prowadzona tylko i wyłącznie z zastosowaniem technik biologii molekularnej (PCR). Diagnostyka gorączki Q u ludzi na podstawie samych objawów klinicznych również nie jest możliwa ponieważ są one grypopodobne. Ponadto, bardzo często jedynym materiałem do badań laboratoryjnych jest krew i badania ograniczają się jedynie do wykrywania obecności przeciwciał.

### 3.8. Cel pracy

Celem badań była:

- Ocena sytuacji epidemiologicznej gorączki Q z uwzględnieniem występowania zakażeń *C. burnetii* zarówno u zwierząt, jak i u ludzi w tym u osób zawodowo narażonych na kontakt ze zwierzętami oraz kleszczy.
- porównanie zastosowanych metod diagnostycznych

### 3.9. Omówienie przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników

Publikacja **nr 3.1** stanowi wstęp do prezentowanego dzieła. Przedstawiłam w niej ogólne informacje na temat czynnika etiologicznego wywołującego gorączkę Q oraz dane na temat występowania *Coxiella burnetii* w stadach bydła ze szczególnym uwzględnieniem krów mlecznych oraz ryzyka przeniesienia tego patogenu na ludzi. Aspekt zagrożenia zoonotycznego jest bardzo istotny z uwagi na fakt coraz częstszego występowania *C. burnetii* w stadach krów mlecznych. Biorąc pod uwagę, że możliwość transmisji drogą alimentarną nie jest wykluczona bydło mleczne stanowić może poważne zagrożenia dla zdrowia ludzi. Ponadto, zaprezentowałam informacje na temat dostępnych metod diagnostycznych z uwzględnieniem ich zalet oraz ograniczeń.

Pierwszy etap badań przedstawiony został w publikacjach **nr 3.2 i 3.3** i związany był z oceną sytuacji epidemiologicznej w zakresie występowania zakażeń *C. burnetii* u ludzi zawodowo narażonych na kontakt ze zwierzętami. Materiał do badań pobierano od leśników z obszaru Polski południowo-wschodniej oraz osób narażonych na kontakt zawodowy ze zwierzętami (pracownicy ferm bydłowych zlokalizowanych w różnych regionach naszego kraju, w których potwierdzono występowanie gorączki Q). Niewykluczona jest też możliwość transmisji patogenu przez wektor, którym są kleszcze (*Ixodes ricinus*), dlatego w badaniach uwzględniono też stawonogi odławiane z terenu Polski południowo-wschodniej uważanej za obszar endemicznego występowania choroby. W sumie badaniami objęto 304 leśników z 12 powiatów, 151 pracowników mających kontakt z bydłem oraz 1200 kleszczy z gatunku *Ixodes ricinus*. Diagnostyka gorączki Q u ludzi prowadzona jest głównie z zastosowaniem technik serologicznych, takich jak: odczyn wiązania dopełniacza (OWD), test immunoenzymatycznego ELISA oraz test immunofluorescencji (IFA). Właśnie te metody zostały wykorzystane w badaniu próbek surowicy od ludzi. Zastosowanie szerokiego panelu badań serologicznych umożliwiło dokładne określenie statusu serologicznego, ponieważ każda z tych metod posiada swoje zalety, ale również pewne ograniczenia diagnostyczne i tak dla przykładu metoda OWD różnicuje przeciwciała na te specyficzne dla antygeny fazy I oraz fazy II, z kolei metoda ELISA i IFA umożliwiają identyfikację klas przeciwciał (IgG i IgM). Przeprowadzenie badań z zastosowaniem trzech różnych metod serologicznych umożliwiło ich porównanie, a poprzez co wiarygodną ocenę ich potencjału diagnostycznego. Badania kleszczy przeprowadzono z zastosowaniem metody real-time PCR z zastosowaniem starterów specyficznych dla fragmentu insercyjnego genu transpozazy IS1111. Wyniki badań serologicznych wykazały obecność przeciwciał anti-*Coxiella burnetii* w badanej grupie leśników. Odsetek wyników dodatnich był zróżnicowany w zależności od zastosowanej metody badawczej. Jednakże najwyższy odsetek wyników dodatnich odnotowano w przypadku metody IF. Odsetek próbek zawierających przeciwciała specyficzne dla fazy I antygeny (faza chroniczna) wynosił 10,52%, podczas gdy test ELISA i OWD wykazały obecność tych przeciwciał tylko w 1,31% i 2,3% badanych surowic, odpowiednio. IFA nie wykazała obecności przeciwciał specyficznych dla fazy ostrej, natomiast ELISA i OWD potwierdziły ich obecność tylko u dwóch osób. Podobne wyniki badań uzyskałam w przypadku badania ludzi narażonych na kontakt ze zwierzętami hodowlanymi (bydłem), gdzie metoda IFA również wykazała, że u większości badanych pacjentów występują przeciwciała specyficzne dla antygeny fazy I. Dodatkowo badaniu poddana została krew pobrana od 71 osób, które były pracownikami ferm w których potwierdzono ogniska gorączki Q. Analiza statystyczna wykorzystana do porównania uzyskanych wyników badań serologicznych wykazała, że IFA jest najbardziej przydatnym narzędziem tzw. „złoty standard” w diagnostyce przewlekłej formy gorączki Q, której wykrycie jest szczególnie ważne z uwagi na ryzyko wystąpienia u tych pacjentów przewlekłego zapalenia mięśnia sercowego. Badania wykazały obecność *C. burnetii* również u kleszczy (15,9%) odławianych z obszaru endemicznego. Są to nowatorskie wyniki badań, do tej pory nikt nie prowadził badań w tym zakresie na terenie naszego kraju. Uzyskane rezultaty wskazują na konieczność zwrócenia szczególnej uwagi na udział kleszczy, jako wektora w transmisji choroby.

Szczególnie interesującym regionem Polski do prowadzenia badań w zakresie epidemiologii gorączki Q jest obszar Polski południowo-wschodniej, który uznawany jest za obszar endemicznego

występowania choroby. Wyniki badań materiału pochodzącego zarówno od ludzi, bydła oraz kleszczy pobieranego z terenu endemicznego przedstawione zostały w publikacji **nr 3.4**. Rezultaty badań serologicznych przeprowadzonych metodą OWD, IFA potwierdziły obecność przeciwciał anti-*Coxiella burnetii* u ludzi, którzy narażeni byli na kontakt z bydlęciem u którego zarówno badania serologiczne, jak i metoda PCR potwierdziły infekcję. Metoda OWD wykazała, że we wszystkich przypadkach były to przeciwciała specyficzne dla fazy II, co wskazuje na ostrą formę choroby, potwierdziły to też badania PCR. Pierwsze badanie wykazało obecność patogenu we krwi badanych ludzi, natomiast badanie po 21 dniach nie potwierdziło już obecności drobnoustroju, co świadczy o skutecznym działaniu układu immunologicznego lub o wnikięciu *Coxielli* do komórek i wówczas jej wykrycie we krwi jest niemożliwe, pomimo toczącej się infekcji. Odsetek zwierząt serododatnich wynosił 21,6%. Z czego w sześciu przypadkach potwierdzono obecność *C. burnetii* metodą real-time PCR w pierwszym badaniu próbek krwi, a następnie w drugim po 21 dniach podobnie, jak w przypadku ludzi uzyskano już wynik ujemny. Odsetek zainfekowany kleszczy w zależności od zastosowanej metody badawczej wniósł odpowiednio w przypadku klasycznej reakcji PCR 25%, natomiast real-time PCR, który jest metodą bardziej czułą 33,3% i był o połowę wyższy niż w wynikach badań prezentowanych w pracy nr 3.3.

Kolejny aspekt moich badań dotyczył występowania *C. burnetii* u bydła (wyniki badań zaprezentowałam w publikacji **nr 3.5**). Badania te są bardzo istotne ponieważ z danych literaturowych wynika, że dane na temat przypadków/ognisk choroby są niedoszacowane, a w niektórych państwach w ogóle nie są prowadzone. W dostępnej literaturze brak było dotychczas danych na temat aktualnej sytuacji epidemiologicznej w zakresie gorączki Q w Polsce. Próbkę do badań pobierano w latach 2014-2015, w sumie przebadano 1150 surowic bydlęcych. Materiał do badań pochodził z różnych województw i powiatów. W sumie badaniami objęto 443 stada bydła. Badania przeprowadzone przy zastosowaniu metody odczynu wiązania dopełniacza wykazały, że średni odsetek stad serododatnich wynosi 40,41%. Najwyższy poziom seroprewalencji odnotowano w woj. lubelskim i mazowieckim. Interesujące wyniki uzyskano dla województwa podkarpackiego, gdzie odsetek stad serododatnich był poniżej średniej krajowej, a obszar ten zaliczany był do terenu wtórnej endemii. Najniższy poziom seroprewalencji w porównaniu do średniej krajowej odnotowano w woj. warmińsko-mazurskim, wielkopolskim i zachodniopomorskim. Uzyskane rezultaty stanowią cenną wiedzę epidemiologiczną, która może zostać wykorzystana zarówno przez Inspekcję Weterynaryjną, jak i Sanitarną w zakresie prowadzenia dalszych badań monitoringowych na tym obszarze z uwzględnieniem również badań molekularnych. Ponadto, stanowiły one podstawę do kontynuacji badań w zakresie charakterystyki molekularnej szczepów *C. burnetii* izolowanej od bydła mlecznego i są realizowane przez mnie w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Śledząc na bieżąco dane literaturowe oraz wykonując badania laboratoryjne zaczęłam dostrzegać, że każda z dostępnych technik posiada pewnego rodzaju ograniczenia diagnostyczne. Dlatego kolejny etap badań związany był z oceną potencjału diagnostycznego dostępnych metod laboratoryjnych (wyniki badań zaprezentowałam w publikacji **nr 3.6**). Publikacja **nr 3.6** przedstawia wyniki badań, które są kontynuacją badań w zakresie porównania i oceny potencjału diagnostycznego metod badawczych przedstawionych w publikacji zał nr.3 pkt. A2 poz. 4. W badaniach tych uwzględniłam porównanie dwóch metod (ELISA i OWD) w ramach techniki serologicznej, a uzyskane wyniki badań zostały odniesione do rezultatów uzyskanych metodą PCR. W badaniach wykorzystano 187 próbek krwi i wymazów z dróg rodnych oraz 97 próbek mleka ze stada w którym potwierdzono ognisko gorączki Q. Celem badań była ocena możliwości wykrycia obecności patogenu metodą qPCR w odniesieniu do wykrywania przeciwciał specyficznych dla antygeny fazy I i II. Badania wykazały, że zmienność fazowa patogenu może mieć wpływ na wyniki badań serologicznych. Wyniki wykazały słabość testu ELISA, kiedy badania prowadzone są na poziomie stada testem z antygenem mieszanym (faza I i II). Stwierdziłam, że test ELISA może być właściwą metodą diagnostyczną zarówno do badań epidemiologicznych, jak i do wykrywania osobników serododatnich na poziomie stada, ale wymaga jednak udoskonalenia w zakresie zdolności do wykrywania przeciwciał specyficznych dla antygenów fazy II o niskim mianie. Ponadto, wykazałam,

że badania serologiczne nie mogą służyć do wiarygodnej oceny siewstwa na poziomie stada i powinny być traktowane jako badania wstępne, które następnie należy uzupełnić o badania metodą real-time PCR. Co ciekawe w badaniach wykazałam pozytywną korelację pomiędzy występowaniem przeciwciał specyficznych dla antygeny fazy II i siewstwem patogenu do mleka, podczas gdy występowanie przeciwciał specyficznych dla antygenów fazy I było negatywnie skorelowane z siewstwem do mleka. Może to świadczyć o dominacji przeciwciał specyficznych dla antygenów fazy II w mleku. Przeprowadzone prze mnie badania wykazały konieczność prowadzenia dalszych badań w zakresie zmienności i różnorodności antygenowej oraz prowadzenia prac w zakresie poszukiwania testu ELISA, który nie będzie generował wyników fałszywie ujemnych w przypadku próbek zawierających niskie miana przeciwciał.

### 3.10. Podsumowanie

Opublikowane wyniki badań stanowią cenny wkład w wiedzę epidemiologiczną i mogą zostać wykorzystane do oceny zagrożenia *C. burnetii* dla zdrowia ludzi i zwierząt, jest to szczególnie ważne z uwagi na fakt, że liczba przypadków gorączki Q u ludzi w Polsce notowana przez Inspekcję Sanitarną jest w znaczącym stopniu niedoszacowana. Dostępne dane wskazują na występowanie pojedynczych przypadków zachorowań, podczas gdy przeprowadzone badania stawiają problem zakażeń *C. burnetii* w zupełnie innym świetle, wskazując na niedoszacowanie danych epidemiologicznych. Prawdopodobną przyczyną bardzo małej liczby notowanych przypadków gorączki Q jest niska świadomość lekarzy w obszarze medycyny ludzkiej zarówno w zakresie diagnozowania, leczenia oraz konsekwencji zdrowotnych dla osób zakażonych *C. burnetii*. Uzyskane przez mnie wyniki mogą przyczynić się do podniesienia świadomości lekarzy oraz rozważenia dopuszczenia do zastosowania w Polsce szczepionki dla ludzi zwłaszcza tych narażonych zawodowo na kontakt ze zwierzętami i kleszczami, poprzez co mogą mieć wymierny wpływ na ochronę zdrowia publicznego. Ponadto, przeprowadzone badania dostarczają danych na temat wad i zalet poszczególnych metod diagnostycznych, co jest niesłychanie ważne przy wyborze metody diagnostycznej.

### 3.11. Wnioski

- Przeprowadzone badania dowodzą, że zakażenia *C. burnetii* stanowią istotny problem w skali naszego kraju o czym świadczy znaczący odsetek wyników serododatnich u bydła (40,41% stad) oraz potwierdzanie jej prewalencji poprzez wykrywanie fragmentu insercyjnego IS1111 metodą real-time PCR.
- Badania dowiodły, że *C. burnetii* stanowi też zagrożenie dla ludzi, co potwierdziły wyniki badań prowadzonych w grupach ludzi narażonych na kontakt zawodowy ze zwierzętami (leśnicy oraz personel obsługujący zwierzęta) lub wektorami *C. burnetii* – kleszczami.
- Przeprowadzone badania wykazały, że ognisko endemii na obszarze Polski południowo-wschodniej jest w dalszym ciągu aktywne, a przypadki choroby stwierdzane są zarówno u bydła, ludzi, jak i kleszczy z tego obszaru oraz w innych regionach Polski.
- Wiarygodna diagnostyka laboratoryjna gorączki Q wymaga jednoczesnego zastosowania różnych technik badawczych, do badań pierwszego rzutu u zwierząt zalicza się test ELISA, należy jednak podkreślić, że posiada on ograniczenia w możliwości wykrywania niskich mian przeciwciał specyficznych dla antygenów fazy II. Natomiast w badaniach potwierdzających zaleca się zastosowanie techniki qPCR. Z kolei w diagnozowaniu przypadków gorączki Q u ludzi za „złoty standard” należy uznać metodę IFA.

#### 4. Ważniejsze osiągnięcia w zakresie badań prowadzonych poza zgłaszanym cyklem tematycznym

##### 4.1. Chlamydioza

Badania naukowe w zakresie chlamydiozy u ptaków podjęłam w 2010 r, wówczas poprzez sekwencjonowanie fragmentu genu *ompA* w próbkach od drobiu stwierdziłam wystąpienie materiału genetycznego pochodzącego od wówczas niesklasyfikowanego gatunku chlamydii. Wyniki tych badań przedstawione zostały w publikacji (zał. nr 3. pkt II A2 poz. 10). Wprowadzone w 2013 r. zmiany w taksonomii *Chlamydiaceae* dowiodły, że jest to *C. gallinacae*. Było to nowatorskie w skali kraju odkrycie i opisanie pierwszego przypadku *C. gallinacae* u kur w Polsce. Od tego momentu zarówno ptaki hodowlane, jak i dziko żyjące stały się przedmiotem moich prac badawczych. W 2014 roku otrzymałam grant w ramach konkursu „Iuventus Plus” finansowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego i rozpoczęłam realizację badań związanych z oceną występowania i zmienności genetycznej *Chlamydia* sp. zarówno u ptaków dziko żyjących, jak i hodowlanych. W ramach projektu przebadalam ponad 800 próbek od ptaków dziko żyjących oraz 1500 próbek od ptaków hodowlanych. Kierowane przez mnie badania doprowadziły do uzyskania bardzo ciekawych, wręcz zupełnie nowatorskich rezultatów. Prowadzona analiza filogenetyczna izolatów DNA uzyskanych od ptaków dzikich wykazała, że w populacji polskich ptaków znaczący odsetek stanowią szczepy, które wykazują bardzo duże podobieństwo do *C. abortus*, które zgodnie z aktualną taksonomią jest czynnikiem odpowiedzialnym za występowanie ronień u przeżuwaczy. Ponadto, niewątpliwym osiągnięciem jest uzyskanie izolatów w liniach komórkowych trzech genotypów ptasiej *C. abortus* (1V, G1 i G2), które dotychczas w literaturze opisany były jako pojedyncze przypadki klasyfikowane jako genotypy *C. psittaci*. W moich badaniach wykazałam, że są genotypy G1 i G2 ptasiej *C. abortus*, które dominują u ptactwa dziko żyjącego w Polsce. Uzyskane wyniki są nowatorskie w skali badań nad chlamydiami, ponieważ rzucają nowe światło na występowanie tego patogenu u ptaków i jednocześnie wskazują obszar do kolejnych badań w zakresie scharakteryzowania genomu wyizolowanych szczepów, które na dendrogramach grupują się w dwóch nowych kładach filogenetycznych zakwalifikowanych jako ptasia *C. abortus*. Badania wykazały, że istnieje konieczność zmiany taksonomii w obrębie rodziny *Chlamydiaceae* i uwzględnienie istnienia ptasich *C. abortus*. Równie ciekawe wyniki badań uzyskałam w trakcie realizacji drugiego etapu tego projektu, który obejmował badania ptaków hodowlanych (kaczki, gęsi, indyki i kury), wstępna analiza filogenetyczna potwierdziła również obecność *C. abortus* w kilku badanych stadach (co do tej pory nie zostało opublikowane w dostępnej literaturze, a za dominujący gatunek Chlamydii u ptaków hodowlanych uważana była *C. psittaci*, a w ostatnim czasie *C. gallinacae*). Ponadto, badania wykazały, że w stadach drobiu w Polsce najczęściej obecna jest *C. gallinacae*, a nie jak do niedawna uważano *C. psittaci*. Obecnie trwają badania nad oceną zróżnicowania tych szczepów. Planuję kontynuację badań w tym zakresie ze szczególnym uwzględnieniem sekwencjonowania całego genomu tych szczepów przy zastosowaniu sekwencjonowania nowej generacji (NGS), oceny potencjału zoonotycznego tych patogenów oraz ich wpływu na potencjalną patogenezę u ptaków. Wyniki badań przeprowadzonych w ramach realizacji tego projektu w zakresie ptactwa dzikiego zostały przesłane do publikacji w czasopiśmie PlosOne i praca jest w trakcie recenzji, natomiast w przypadku ptaków hodowlanych trwają ostatnie badania i prowadzona jest interpretacja wyników, w najbliższym czasie przygotowany zostanie manuskrypt, który również planuję opublikować w czasopiśmie PlosOne.

W ostatnim czasie zaangażowana byłam również w wykonywanie badań w kierunku wykrywania i identyfikacji patogenów z rodziny *Chlamydiaceae* u inwazyjnych gatunków żółwi. W badaniach wymazów z kloaki wykazano obecność materiału genetycznego specyficznego dla *Chlamydiaceae*, dalsze badania (sekwencjonowanie fragmentu genu *ompA*) nad identyfikacją gatunku Chlamydii potwierdziły obecność nowego gatunku, który dotychczas nie został opisany i sklasyfikowany, a w analizie filogenetycznej wykazuje najbliższy związek z *C. pneumoniae*.

Aktualnie trwają prace nad izolacją tego szczepu w linii komórkowej, w celu dalszej charakterystyki tego gatunku.

W obszarze moich zainteresowań naukowych znajdują się też badania w zakresie chlamydiozy u bydła. Badania te realizowane są głównie w ramach Programu Wieloletniego oraz działalności referencyjnej. Są one związane głównie z oceną poziomu seroprewalencji u bydła w Polsce. Przeprowadzone dotychczas badania wskazują, że odsetek zakażeń jest na poziomie poniżej 10%. Dla przykładu badania przeprowadzone w latach 2009-2011 i zaprezentowane w publikacji (zał. nr 3, pkt. II A2, poz. 11) wykazały, że odsetek zwierząt serododatnich wykazujących objawy kliniczne ze strony układu rozrodczego wyniósł 4,15%, natomiast odsetek zwierząt bez objawów klinicznych wynosił 7,20%.

Wyniki badań dotyczące ww. zakresu opublikowano patrz zał. nr 3 pkt. II A2. poz. 1, 9-13.

#### 4.2. Mykoplazmoza bydła

Uczestniczyłam również w realizacji badań, zarówno serologicznych, jak i molekularnych w zakresie mykoplazmozy bydła, w obszarze moich badań znajdowały się: *M. mycoides* (MmmSc) (zaraza płucna bydła), *M. bovis*, *M. agalactiae*. Badania te realizowane były w ramach Programu Wieloletniego oraz działalności statutowej. *M. bovis* odgrywa ważną rolę w rozwoju syndromu oddechowego bydła (BRD), który jest przyczyną poważnych strat w hodowli bydła zarówno w Polsce, jak i innych państwach europejskich. *M. mycoides* uważana jest za patogen, który został eradykowany w Europie, ale z uwagi na fakt jakie zagrożenie dla hodowli bydła może stanowić zaraza płucna monitorowanie sytuacji epidemiologicznej jest istotnym elementem w kontroli chorób zwalczanych z urzędu. Z tego względu monitoring w zakresie występowania *M. bovis* i *M. mycoides* jest jak najbardziej pożądany. W badaniach określony został poziom seroprewalencji oraz prewalencji u bydła w Polsce z uwzględnieniem wszystkich regionów administracyjnych kraju. Przeprowadzone badania wykazały, że *M. bovis* jest patogenem szeroko rozpowszechnionym w populacji bydła w Polsce, a aktualny poziom jego seroprewalencji wynosi średnio 56%. Najwyższy przy tym odsetek stad serododatnich stwierdzono w południowo-zachodnim regionie kraju (64,3%), a najniższy w północnym (42,9%). Są to wyniki badań z ostatnich trzech lat, natomiast pierwsze badania, których wyniki opublikowano w 2012r. wykazały, że odsetek stad serododatnich w których obserwowano występowanie objawów klinicznych wynosił 80,89%. Natomiast w przypadku stad zdrowych seroprewalencję potwierdzono w 65,48%. Ponadto, wykazano też obecność mieszanych infekcji, w których *M. bovis* towarzyszyły niejednokrotnie inne patogeny z klasy *Mollicutes*. Nie wykazano istotnej zależności pomiędzy występowaniem i nasileniem objawów klinicznych u badanego bydła, a zjawiskiem konfekcji *M. bovis* z innymi gatunkami mykoplazm. Wykazano, że badane szczepy terenowe *M. bovis* wykazują profil nukleotydowy dla genu *uvrC* zbliżony do szczepu wzorcowego *M. bovis* PG45, co może świadczyć, że jest on ich prekursorem. Nie mniej jednak, część z nich wykazywała mutacje punktowe w odniesieniu do szczepu wzorcowego. Izolaty terenowe *M. bovis* należą do dwóch grup filogenetycznych: grupy I (30% badanych szczepów), w ramach której występują cztery różne podgrupy (A-D) oraz grupy II (70% badanych szczepów) z dwiema podgrupami (F i G). Ponadto, wyniki badań uzyskane przy zastosowaniu różnych metod badawczych zostały poddane analizie statystycznej, która wykazała dodatnią korelację pomiędzy nimi. Najniższy stopień korelacji stwierdzono pomiędzy testem ELISA dla wykrywania przeciwciał, a pozostałymi metodami diagnostycznymi. Najwyższą wartość współczynnika korelacji stwierdzono pomiędzy wynikami otrzymanymi metodą izolacji, a metodą ELISA dla wykrywania obecności antygenu, PCR/DGGE i PCR, co wskazuje, że są to metody najbardziej przydatne w diagnostyce zakażeń *M. bovis*. Badania w zakresie występowania zarazy płucnej bydła potwierdziły, że jest to choroba nie występująca w Polsce. Wyniki tych badań zaprezentowano w publikacjach (zał. nr 3 pkt. II A2 poz. 8, 15, 17).

### 4.3. Borelioza i kamylobakterioza

Kieruję też realizacją badań w kierunku boreliozy w ramach działalności Laboratorium Referencyjnego. Do tej pory została wdrożona do stosowania metoda serologiczna do wykrywania przeciwciał anty *Borrelia burgdorferi* sensu lato u psów oraz metoda qPCR do wykrywania materiału genetycznego krętka borrelii w materiale biologicznym od ludzi i zwierząt oraz kleszczy. Ponadto, w ostatnim czasie wdrożyłam również do zastosowania test qPCR do wykrywania patogenów będących przyczyną chorób odkleszczowych u człowieka: *Borrelia burgdorferi sensu lato*, wirus *TBEV*, *Ehrlichia chaffeensis/Ehrlichia muris* i *Anaplasma phagocytophilum*.

Wyniki tych badań zaprezentowano w publikacji patrz zał. nr 3 pkt. II A2. poz. 2.

### 4.4. Badanie wpływu toksyny *Mannheimia haemolytica*, PI3V i BRSV, i *M. bovis* na stan układu immunologicznego cieląt

Uczestniczyłam w badaniu eksperymentalnym na cielętach, którym podawano donosowo atenuowany wirus: PI3V (parainfluenza typu 3) i BRSV (bovine respiratory syncytial virus). Zwierzęta podzielone były na dwie grupy: grupę doświadczalną i kontrolną. Immunofenotypowanie limfocytów krwi obwodowej przy zastosowaniu metody cytometrii przepływowej wykazało istotny wzrost subpopulacji komórek CD2<sup>+</sup> (limocyty T), CD4<sup>+</sup> (limfocyty pomocnicze), CD8<sup>+</sup> (limfocyty cytotoksyczne/supresorowe) i CD11b<sup>+</sup> (podjednostka β2 integryny). Wzrost tych parametrów obserwowano w trakcie całego eksperymentu. Ponadto, wykazano, że CD4:CD8 we krwi obwodowej był niższy podczas całego eksperymentu w odniesieniu do grupy kontrolnej, ale różnice istotne statystycznie odnotowano pomiędzy 6, a 48 h eksperymentu. Badania wykazały, że donosowe podanie atenuowanych szczepów PI3V and BRSV stymuluje odpowiedź zarówno typu komórkowego, jak i humoralnego, które skutkuje efektem obronnym przed infekcją.

Podobny schemat doświadczenia zastosowano w badaniu wpływu leukotoksyny *Mannheimia haemolytica*. Toksyna podana została dożylnie w ilości 25μg na cielę, a krew do badań cytometrycznych pobierano co 1, 2, 3, 4, 5, 6 i 24 h. Rutynowe badania hematologiczne wykazały znaczący wzrost liczby leukocytów (WBC), PMNL (granulocytów obojętnochłonnych) oraz tzw. komórek MID. Immunofenotypowanie leukocytów krwi obwodowej cieląt wykazało widoczny spadek odsetka poszczególnych subpopulacji limfocytów (CD2<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) w odniesieniu do zwierząt z grupy kontrolnej. Przeciwnie rezultaty obserwowano w przypadku subpopulacji WC4<sup>+</sup> czyli limfocytów B obserwowano ich wyraźny wzrost w pierwszych trzech godzinach eksperymentu. Reasumując, badania wykazały, że jednorazowe podanie leukotoksyny *M. hemolytica* zdrowym cielętom skutkuje leukopenią manifestującą się obniżeniem liczby komórek WBC oraz odsetkiem komórek PMNL, MID i niektórych subpopulacji leukocytów (CD2<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>).

Efektom tego etapu badań było powstanie publikacji (patrz zał. nr 3 pkt. II A1. poz. nr 4, 5, 7).

## 5. Piśmiennictwo związane z tematyką badań

1. Agger J.F., Paul S.: Increasing prevalence of *Coxiella burnetii* seropositive Danish dairy cattle herds. *Acta. Vet. Scan.* 2014, 56, 46.
2. Angelakis E., Raoult D.: Q fever. *Vet Microbiol.* 2010, 140, 297–309.
3. Arricau-Bouvery N., Rodolakis A.: Is Q fever an emerging or reemerging zoonosis? *Vet. Res.* 2005, 36, 327–349.
4. Astobiza I., Ruiz-Fons F., Pinero A., Barandika J.F., Hurtado A., Garcia-Perez A.L.: Estimation of *Coxiella burnetii* prevalence in dairy cattle in intensive systems by serological and molecular analyses of bulk-tank milk samples. *J. Dairy Sci.* 2012, 95, 1632–1638.
5. Czaplicki G., Houtain J-Y, Mullender C., Manteca C., Saegerman C.: Bulk tank milk, reliable tool for diagnosing Q fever? *Epidemiol. Santei. Anim.* 2009, 56, 117–127.



6. Frangoulidis D., Walter M.C., Antwerpen M., Zimmermann P., Janowitz B., Alex M., Böttcher J., Henning K., Hilbert A., Ganter M., Runge M., Münsterkötter M., Spletstoesser W.D., Hanczaruk M.: Molecular analysis of *Coxiella burnetii* in Germany reveals evolution of unique clonal clusters. *Int J Microbiol* 2014, 304, 868-876.
7. Galińska EM, Knap JP, Chmielewska-Badora J, 2011: Wstępne wyniki badań seroepidemiologicznych i klinicznych w kierunku gorączki Q u osób zawodowo narażonych. *Med Ogólna*. 2011; 17: 001-006.
8. Landais C, Fenollar F, Thuny F, Raoult D. From acute Q fever to endocarditis: serological follow-up strategy. *Clin Infect Dis*. 2007; 44: 1337-13340.
9. McCaughey C., Murra
10. y L.J., McKenna J.P., Menzies F.D., McCullough S.J., O'Neill H.J., Wyatt D.E., Cardwell C.R., Coyle P.V. *Coxiella burnetii* (Q fever) seroprevalence in cattle. *Epidemiol. Infect.* 2010, 138, 21-27.
11. Muskens J., van Englen E., van Manen C., Bartles C., Lam T.J.G.M.: Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in Dutch dairy herds based on testing bulk tank milk and individual samples by PCR and ELISA. *Vet. Rec.* 2011, 168, 79.
12. Rehn F, Radvan R. Isolation of *Coxiella burnetii* from the tick *Ixodes ricinus*. *Cesk. Epidemiol. Mikrobiol. Imunol* 1957; 6: 85-88.
13. Ryan E.D., Kirby M., Collins D.M., Sayers R., Mee J.F., Clegg T.: Prevalence of *Coxiella burnetii* (Q fever) antibodies in bovine serum and bulk-milk samples. *Epidemiol. Infect.* 2011, 139, 1413-1417.
14. Schneeberger P.M., Wintenberger C., van der Hoek W., Stahl J.P.: Q fever in the Netherlands – 2007–2010: what we learned from the largest outbreak ever. *Med Mal Infect* 2014, 44, 339–353.
15. Sidi-Boumedine K, Rousset E, Henning K, Ziller M. Development of harmonised schemes for the monitoring and reporting of Q fever in animals in the European Union. *EFSA Report*. 2010: 1-48.
16. Sprong H, Tjisse-Klasen E, Langelaar M, De Bruni A, Fonvill M, Grassner F, et al. Prevalence of *Coxiella burnetii* in ticks after a large outbreaks of Q fever. *Zoonoses Public Health* 2012; 59: 69-75.
17. Ustawa z 11.03.2004 o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych, Dz.U. 2014 poz. 1539 dla ustawy Dz.U. 2004, nr 69 poz. 625.
18. Tilburg J.J., Roest H.J., Nabuurs-Franssen M.H., Horrevorts A.M., Klaassen C.H.: Genotyping reveals the presence of a predominant genotype of *Coxiella burnetii* in consumer milk products. *J Clin Microbiol* 2012, 50, 2156–2158.
19. Benson W.W., Brock D.W., Mather J.: Serological analysis of a penitentiary group using raw milk a Q fever infected herd. *Public Health Rep* 1963, 78, 707-710.

## 6. Podsumowanie dorobku naukowego

Szczegółowy wykaz dorobku naukowego znajduje się w zał. nr 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

**Tabela 1. Zestawienie publikacji z listy JCR z uwzględnieniem wskaźnika impact factor, liczby punktów MNiSW oraz liczby cytowań**

czasopismo	rok publikacji	liczba publikacji	impact factor	liczba punktów wg MNiSW	liczba cytowań
Bull Vet Inst Pulawy	2007	1	0,273	15	-
	2009	2	0,218	15	3
	2010	1	0,321	20	7
	2011	3	0,414	20	8
	2012	2	0,377	20	1
	2013	1	0,365	20	3
	2014	2	0,357	15	1
Medycyna Weterynaryjna	2007	1	-	10	-
	2008	1	-	10	-
	2011	4	-	9	2
	2014	1	0,218	15	-
Veterinary Record	2012	1	1,803	30	8
Annals Agriculture and Environmental Medicine	2013	2	3,06	30	9
Veterinary Microbiology	2014	1	2,511	40	7
Annals and Animals Sciences	2014	1	1,126	20	-
Vector Born and Zoonotic Diseases	2015	1	1,956	25	2
	2016	1	1,956	25	1
Research in Veterinary Sciences	2016	1	1,50	35	-
Central European Journal of Immunology	2009	1	-	4	6
Animal Science Papers and Reports	2016	1	0,718	25	-
suma		<b>30</b>	<b>22,48</b>	<b>565</b>	<b>58</b>

**Indeks Hirscha =6**

**Tabela 2. Zestawienie dorobku publikacyjnego przed i po uzyskaniu stopnia doktora**

rodzaj publikacji	przed doktoratem	po doktoracie	łącznie
publikacje w czasopismach z listy JCR	7	23	30
prace naukowe opublikowane w formie rozdziału w recenzowanym wydawnictwie zbiorowym	8	13	21
artykuły w czasopismach popularnonaukowych	7	4	11
wykłady wygłoszone na konferencjach			
krajowych	0	1	1
międzynarodowych	0	12	12
doniesienia posterowe na konferencjach			
krajowych	1	0	1
międzynarodowych	6	12	18
łącznie	29	64	96

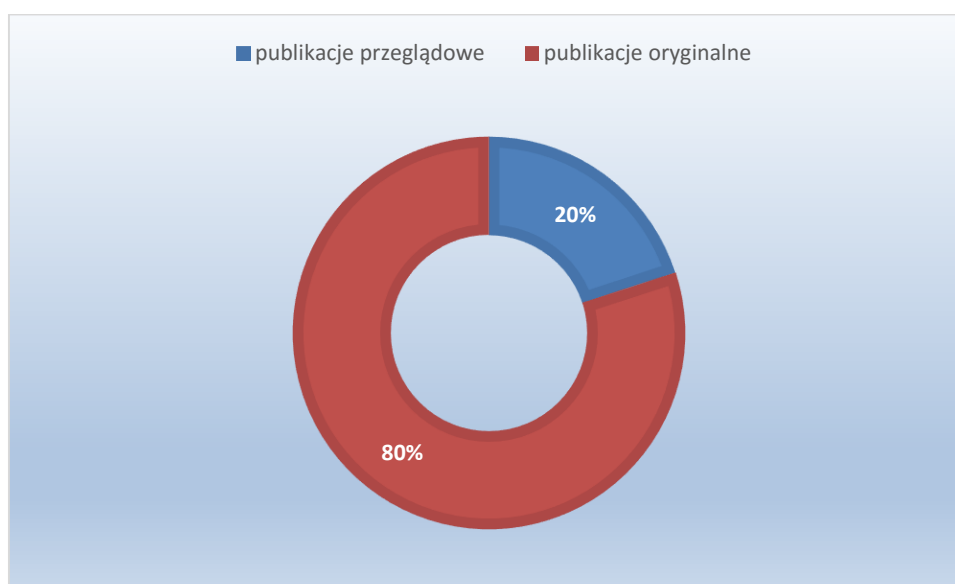
**Tabela 3. Zestawienie dorobku publikacyjnego (publikacje z listy JCR) z podziałem na prace oryginalne i przeglądowe przed i po doktoracie**

Rodzaj publikacji	przed doktoratem			po doktoracie		
	liczba	IF	pkt. MNiSW	liczba	IF	pkt. MNiSW
Oryginalne prace twórcze (w tym wykorzystane w rozprawie habilitacyjnej)	6 (0)	1,03 -	79 (0)	13 (5)	9,78 (8,40)	261 (125)
Artykuły przeglądowe (w tym wykorzystane w rozprawie habilitacyjnej)	1 (0)	0 -	10 (0)	4 (1)	2,91 (0,357)	75 (15)
suma	7 (0)	1,03	89 (0)	17 (6)	11,18 (8,759)	336 (140)
sumaryczny IF		1,03			21,45	
					<b>22,48</b>	
Całkowita liczba pkt. MNiSW						<b>565</b>

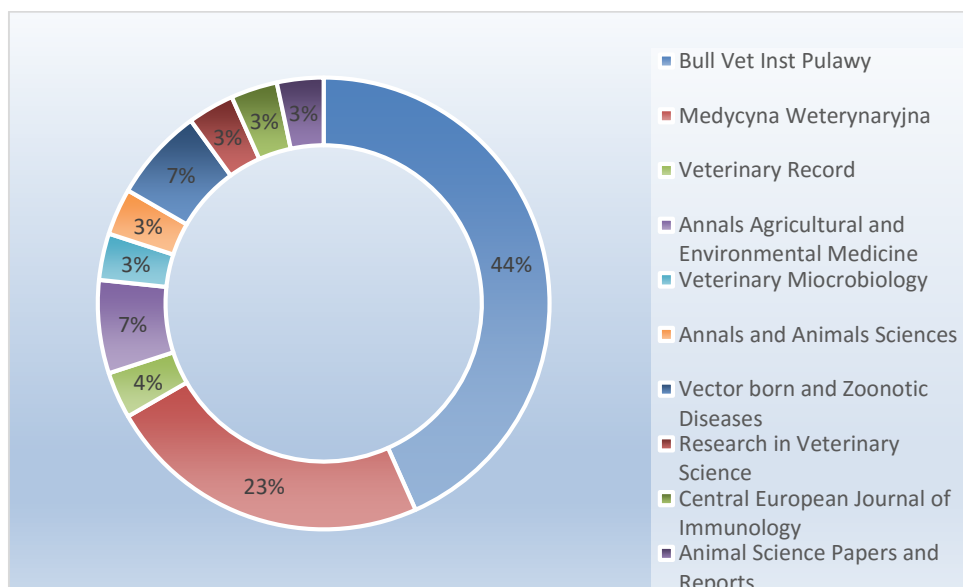
**Tabela 4. Zestawienie dorobku publikacyjnego (publikacje z listy JCR) z uwzględnieniem miejsca w szeregu autorskim oraz języka publikacji**

	przed doktoratem	po doktoracie	suma
pierwszy autor	4	16	20
drugi autor	1	5	6
trzeci lub kolejny autor	2	2	4
publikacje w języku polskim	2	4	6
publikacje w języku angielskim	5	19	24

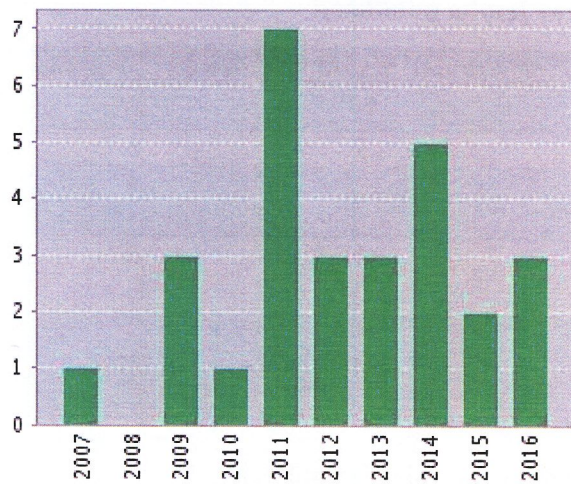
**Rycina 1. Podział publikacji ze względu na rodzaj publikacji**



**Rycina 3. Podział publikacji ze względu na rodzaj czasopisma**

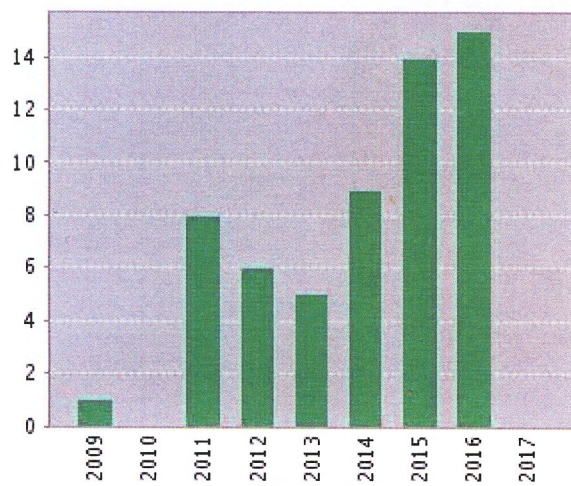


**Rycina 6. Liczba publikacji w poszczególnych latach**



Źródło: Web of Science (WoS)

**Rycina 5. Liczba cytowań w odniesieniu do poszczególnych lat**



Źródło: Web of Science (WoS)

Puławy, 2016-12-22

*Szymanski*