

Olsztyn, 28.06.2018 r

dr hab. Aleksandra Platt-Samoraj, prof. UWM
Katedra Epizootologii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
w Olsztynie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej **lek. wet. Agnieszki Jodelko** pt. „**Genotypowanie szczepów *Coxiella burnetii* występujących u bydła oraz ocena możliwości transmisji patogenu drogą alimentarną**”

wykonanej pod kierunkiem Pana dr hab. Krzysztofa Niemczuka, prof. nadzw.

oraz dr hab. Pani Moniki Szymańskiej-Czerwińskiej, prof. nadzw.

w Zakładzie Chorób Bydła Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

Podstawę formalną recenzji stanowi pismo Przewodniczącego Komisji Doktorskiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach prof. dr hab. Dariusza Bednarka z dnia 30.05.2018 r. powołujące się na uchwałę Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach z dnia 27.04.2016 r.

Coxiella burnetii (*C. burnetii*) jest czynnikiem etiologicznym Gorączki Q, choroby zoonotycznej stanowiącej istotne zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. Z tego powodu objęta została obowiązkiem rejestracji przez wszystkie kraje Unii Europejskiej, a liczba zgłoszonych przypadków umieszczana jest w corocznych raportach Europejskiego Urzędu do Spraw Bezpieczeństwa Żywności.

C. burnetii jest drobnoustrojem o niezwykłych właściwościach, takich jak zdolność do występowania w dwóch odmianach antygenowych, czy tworzenie dwóch form morfologicznych, wegetatywnej i przetrwalnikowej, dzięki czemu wykazuje nadzwyczajną oporność na warunki środowiska zewnętrznego. Gorączkę Q opisano w latach 30. ubiegłego wieku, lecz przez szereg lat była niedoceniana zarówno przez lekarzy weterynarii, jak i lekarzy medycyny. Choroba ta nie jest łatwa w diagnozowaniu, głównie ze względu na brak wzrostu *C. burnetii* na podłożach bakteriologicznych oraz różnorodność objawów klinicznych, dodatkowo skutki zakażenia często oddalone są w czasie. W medycynie weterynaryjnej gorączkę Q długo traktowano jako niegroźną chorobę, bez wpływu na bilans ekonomiczny hodowli zwierząt. Na zmianę tych poglądów wpłynęła m. in. niedawna epidemia gorączki Q w Holandii. Ciągłe jednak nie poznano wielu aspektów związanych z samym zarazkiem, epidemiologią choroby czy metodami jej leczenia i zapobiegania. Zdolność do masowych wybuchów choroby u ludzi i zwierząt, możliwość wykorzystania zarazka jako broni biologicznej, nie poznane do końca drogi szerzenia choroby i skala rozprzestrzenienia zakażeń wymuszają dalsze badania nad gorączką Q i jej czynnikiem etiologicznym. Dlatego też podjęcie przez lek. wet. Agnieszkę Jodelko badań dotyczących określenia rozprzestrzenienia zakażeń i genotypowania szczepów *C. burnetii* występujących u bydła w Polsce oraz badanie możliwości zakażenia drobnoustrojem drogą pokarmową są w pełni uzasadnione.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska o układzie typowym dla tego rodzaju opracowań liczy 139 stron i składa się z 10 rozdziałów takich jak Wstęp, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenia w językach polskim i angielskim, Piśmiennictwo oraz Aneks-załączniki. Dysertacja zawiera 13 rycin, 18 tabel oraz 6 załączników.

We wstępie, poprzedzonym wykazem stosowanych skrótów, obejmującym 16 stron Doktorantka umiejętnie przedstawiła obowiązujący stan wiedzy, opisała systematykę, budowę morfologiczną i antygenową, właściwości *C. burnetii* oraz przedstawiła rys historyczny badań nad drobnoustrojem. Następnie, w sposób wyczerpujący opisała epidemiologię gorączki Q, patogenezę, diagnostykę, zwalczanie i profilaktykę zakażeń *C. burnetii* zarówno u zwierząt, jak i u ludzi. Wstęp dowodzi bardzo dobrej znajomości badanej problematyki i piśmiennictwa oraz uzasadnia celowość podjętych badań.

W rozdziale zatytułowanym „Cel pracy” lek. wet. Agnieszka Jodełko przedstawiła w trzech punktach jasno sformułowane cele:

1. Określenie poziomu seroprewalencji oraz prewalencji *C. burnetii* w stadach bydła w Polsce.
2. Wykonanie charakterystyki molekularnej szczepów terenowych patogenu z wykorzystaniem metod MST oraz MLVA.
3. Ocena możliwości transmisji patogenu drogą alimentarną poprzez przeprowadzenie doświadczenia na modelu kawii domowej.

Rozdział „Materiał i metody”, liczący 20 stron zawiera 9 podrozdziałów. Przedstawiony zakres badań obejmował trzy etapy: 1 - badanie poziomu seroprewalencji w stadach bydła, 2 - badania molekularne próbek mleka, mleka zbiorczego, wymazów z dróg rodnych i wycinków łożyska z wykorzystaniem real-time PCR oraz badanie genotypowe wykrytych sekwencji IS1111, specyficznych dla *C. burnetii* i 3 - doświadczenie *per os* kawii domowej.

Materiał do badań serologicznych stanowiło 2635 próbek pochodzących z 969 stad, i co należy podkreślić, pochodzących ze wszystkich województw. Badaniom molekularnym poddano łącznie 1439 próbek z 279 stad, w tym 897 próbek mleka, 101 próbek mleka zbiorczego, 409 wymazów z dróg rodnych oraz 32 wycinki łożysk. Materiał badawczy jest ogromny, pochodzi z wielu jednostek z całej Polski, lecz ujęcie danych w tabele i ryciny ułatwia orientację.

Niewątpliwie ciekawym elementem pracy o charakterze poznawczym jest eksperymentalne zakażenie *per os* kawii domowych. Wyniki doświadczenia mogą przyczynić się do wzbogacenia wciąż niepełnej wiedzy na temat patogenezы zakażeń *C. burnetii*. Nasuwa się jednak pytanie, dlaczego zakażono tylko samce, zważywszy na tropizm badanego drobnoustroju? Brakuje też informacji ile razy podano inokulat zwierzętom w grupach II i IV.

Należy podkreślić, że Autorka podjęła się zrealizowania ambitnych i nowatorskich zadań o bardzo szerokim spektrum. Na uznanie zasługuje też zastosowanie nowoczesnych metod molekularnych, jak real-time PCR i MST i MLVA.

Wyniki zostały przedstawione na 20 stronach, obejmują obszerny i szczegółowy opis uzyskanych rezultatów badań oraz bogatą dokumentację graficzną w postaci 9 tabel i 10 rycin, uzupełnionych tabelami zawartymi w aneksach zamieszczonych na ostatnich stronach dysertacji. Rozdział obejmuje wyniki badań serologicznych surowicy i mleka, wyniki badania materiału biologicznego pochodzącego od bydła, mleka i produktów mlecznych metodą real-time PCR, analizę statystyczną badań serologicznych i molekularnych próbek

mleka, wyniki genotypowania materiału genetycznego *C. burnetii* pochodzącego ze stad bydła, z mleka i produktów mlecznych metodami MLVA i MST oraz wyniki doświadczalnego zakażenia kawy domowej. Uzyskane rezultaty są bardzo interesujące i wnoszą nowe wartości do obecnego stanu wiedzy na temat rozprzestrzenienia zakażeń w stadach bydła oraz na temat charakterystyki genotypowej szczepów *C. burnetii* występujących w Polsce. Na szczególne uznanie zasługuje wykrycie 3 nowych genotypów *C. burnetii* metodą MLVA i 1 nowego typu sekwencyjnego metodą MST.

Interesującym elementem recenzowanej rozprawy jest rozdział „Dyskusja” liczący 14 stron, zawierający krytyczną analizę wyników badań własnych w konfrontacji z wynikami uzyskanymi przez innych autorów. Lek. wet. Agnieszka Jodełko w rozdziale tym dowiodła umiejętności prowadzenia naukowej polemiki, a odpowiednio dobrane piśmiennictwo świadczy o szerokiej znajomości badanej problematyki.

Recenzowaną pracę doktorską wieńczy osiem wniosków dokumentujących realizację zaplanowanych celów badawczych, streszczenia w językach polskim i angielskim oraz wykaz aż 223 pozycji piśmiennictwa dowodzący umiejętności doboru literatury odpowiedniej do analizy i dyskusji uzyskanych wyników badań własnych.

Reasumując, należy stwierdzić, że wykonane przez Doktorantkę obszerne i pracochłonne badania dostarczyły ciekawych i cennych wyników poznawczych oraz aplikacyjnych, zasługujących na pozytywną ocenę. Lek. wet. Agnieszka Jodełko wykazała, że *C. burnetii* jest drobnoustrojem rozpowszechnionym w populacji bydła w całej Polsce. Przeciwciała w surowicy wykazano w ponad 24%, a w próbkach mleka zbiorczego aż w 45,5% badanych stad. Wyniki badań molekularnych świadczą o siewstwie drobnoustroju w prawie 32% stad w Polsce, a blisko 70% badanych produktów mlecznych zawierało materiał genetyczny *C. burnetii*. Autorka wykazała też znaczne zróżnicowanie genetyczne szczepów *C. burnetii* aktualnie krążących w populacji bydła w Polsce oraz wykazała istnienie nowych, nie opisanych jeszcze genotypów. Wykazała też powiązania genetyczne szczepów występujących u bydła w naszym kraju z opisanymi w międzynarodowych bazach danych jako pochodzące z przypadków klinicznych u ludzi. Potwierdzona też została możliwość zakażenia drogą pokarmową, co w korelacji z wykazaniem obecności materiału genetycznego drobnoustroju w komercyjnych produktach mlecznych ma istotne znaczenie epidemiologiczne.

Można zatem uznać, że uzyskane wyniki stanowią unikalny materiał badawczy odzwierciedlający rzeczywistą sytuację epizootyczną zakażeń *C. burnetii* u bydła w Polsce.

Szczegółowa analiza rozprawy ujawniła jednak kilka nieścisłości i błędów, których Autorka nie ustrzegła się przygotowując ostateczną wersję rozprawy, zatem jako recenzent zobowiązana jestem je przedstawić w formie uwag krytycznych.

- Na początku rozprawy Autorka zamieściła bardzo przydatny „Wykaz skrótów stosowanych w pracy”, w którym wymieniła nawet tak powszechnie stosowane skróty, jak godz. – godzina, kg – kilogram, km – kilometr, m – metr, mg – miligram, czy s – sekunda. Jednak później w pracy niepotrzebnie używała częściej pełnego terminu (str. 36, 37, 38, 42).
- Brakuje też pewnej konsekwencji w wyjaśnianiu skrótów. W przypadku części skrótów, jeśli pochodziły od anglojęzycznych terminów, w nawiasach podawane są angielskie znaczenia i obok polskie nazewnictwo. W niektórych podana jest tylko polska nazwa (np. PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy), a w części tylko tłumaczenie skrótu w języku angielskim (np. ACCM, MLVA, MST).

- Wykaz nie zawiera wyjaśnienia wszystkich stosowanych w pracy skrótów. Zabrakło m. in.: CR3 - (complement receptor 3), str. 14; LC3 - (light chain 3), str. 14; LAMP (lysosome-associated membrane glycoprotein), str. 14; IS 1111 (insertion sequence), str. 12, 20; 29, 39, 40, 50. 73. 87; sod (superoxide dismutase gen), str. 20; com1 (cell outer membrane 1) gen kodujący białko zewnętrzne komórek, str. 20; htpA, B (heat shock protein A, B) białko szoku termicznego, str. 20.
- W objaśnienie skrótu SNP – zamiast „polimorfizm pojedynczego nukleotydu”, powinno być: „polimorfizm pojedynczego nukleotydu”. Podobny błąd znalazł się również w „Dyskusji ” na str. 84.
- We „Wstępie”, na str. 9, w podrozdziale poświęconym charakterystyce *C. burnetii* Doktorantka napisała cyt.: „Cechy te warunkują długotrwałą przeżywalność patogenu w środowisku pozakomórkowym oraz dużą odporność na działanie czynników fizycznych i chemicznych(...)” Odporność (*immunitas*) to zdolność organizmów wyższych do obrony przed antygenami. Autorce zapewne chodziło o oporność (*resistance*), czyli niewrażliwość na działanie czynników zewnętrznych. Podobny błąd znalazł się również na str. 10.
- Cytowana na str. 9 praca Ning i wsp., 1993 nie widnieje w spisie literatury, jest natomiast Ning i wsp., 1992. Powinno też być Seshadri i wsp. 2003, zamiast Seshadri, 2003. Podobnie na str. 11, jest Guatteo, 2011, zamiast Guatteo i wsp., 2011.
- Na str. 11, 72, 85, znalazła się informacja o występowaniu siewstwa *C. burnetii* „do mleka” – prawidłowo powinno być: „siewstwo z mlekiem”, co wynika z silnego powinowadztwa patogenu do komórek epitelialnych gruczołu mlekowego.
- Na str. 11, opisując największą epidemię gorączki Q w Holandii Autorka napisała, że służby weterynaryjne i sanitarne podjęły decyzję o eradykacji kóz i owiec. Zapewne chodziło o eutanazję, lub wybiecie zwierząt. W epidemiologii termin eradykacja odnosi się do choroby. Zatem, zwierzęta poddano ubojowi w celu eradykacji gorączki Q.
- Na str. 12, cytowana jest praca autorstwa Knap, 2009. Niestety, artykuł ten nie znalazł się w wykazie piśmiennictwa.
- W całej pracy, moim zdaniem, nadużywane jest określenie „infekcja”, które ma przecież swój odpowiednik w języku polskim - „zakażenie”
- Na str. 17, znalazło się określenie „(...)zainfekowanych gospodarstw(...)”. Gospodarstwa nie mogą być zainfekowane, ponieważ zakażenie dotyczy organizmów żywych. Zgodnie z terminologią epidemiologiczną gospodarstwa mogą zawierać zwierzęta zakażone, mogą być zapowietrzane, lub zanieczyszczone zarazkiem.
- Pisząc o „okresie latencji” na str. 28, sądzę, że Autorka miała na myśli zakażenie utajone, typowe dla przewlekłych chorób bakteryjnych. Zakażenie latentne dotyczy zakażeń wirusowych i związane jest z wbudowaniem informacji genetycznej wirusa w genom gospodarza (Wawrzekiewicz, „Mikrobiologia Weterynaryjna”, PWN, 1983).
- Na str. 19 i 20, Autorka powołuje się na publikację OIE, 2015, natomiast w wykazie literatury jest OIE 2016.
- Str. 21, cytowany jest Vincent, 2014, w wykazie literatury jest Vincent 2013 i Vincent i wsp., 2016.
- Str. 30, 31, 49, 72, zamiast „Próbki surowicy krwi” – wystarczy „próbki surowicy”.

- W rozdziale „Materiał i metody”, na str. 33, znajduje się Tabela 4 zatytułowana „Wyniki badań molekularnych produktów mlecznych wybranych do genotypowania metodami MLVA i MST”, na którą Autorka powołuje się wyszczególniając produkty mleczne dostępne w sprzedaży. Tabela powinna zostać przeniesiona do rozdziału Wyniki, lub jej zawartość zredukowana do rodzaju produktu mlecznego i kodu producenta, a tytuł zmieniony.
- Na str. 40 rozdziału „Materiał i metody”, w podrozdziale „Metoda MLVA” Autorka szczegółowo opisuje metodę, przedstawia historię jej powstania, cytuje autorów, którzy ją opracowywali i modyfikowali itp. Sądzę, że taka dyskusja powinna być przeniesiona w inne miejsce rozprawy.
- Str. 41, zamiast „mieszanina dNTP-ów” powinno być „mieszanina dNTP”.
- Str. 48, w podrozdziale „Materiał i metody” zatytułowanym „Badania histopatologiczne narządów” znalazła się polemika na temat spodziewanych zmian anatomopatologicznych pojawiających się w przebiegu zakażeń *C. burnetii* wraz odwoływaniem się do pozycji literaturowych opisujących doświadczalne zakażenia. Taka dyskusja moim zdaniem, powinna znaleźć się w innym rozdziale.
- W rozdziale „Wyniki”, Tabela 11 na str. 51 zatytułowana jest „Liczba badanych stad w zależności od rodzaju pobranego materiału do badań real-time PCR”. Tytuł nie odzwierciedla rzeczywistej zawartości tabeli. Przypuszczam, że miało być: „Liczba badanych stad dodatnich w zależności od rodzaju pobranego materiału do badań real-time PCR”.
- Podrozdział 4.6 rozdziału „Wyniki” (str. 57) został zatytułowany „Genotypowanie *C. burnetii* pochodzące z mleka i produktów mlecznych dostępnych w sprzedaży metodą MLVA”. Powinno być „Genotypowanie materiału genetycznego *C. burnetii* pochodzącego z mleka i produktów mlecznych dostępnych w sprzedaży metodą MLVA”.
- W zasadzie nie powinno się stawiać kropek po tytule tabeli, natomiast tytuły rycin zwykle znajdują się pod nimi.
- Artykuł cytowany na str. 77, w rozdziale „Dyskusja”, autorstwa Arricau-Bouvery i wsp. (2005) nie ma odpowiednika w spisie literatury. Są publikacje tych autorów z lat 2003 i 2006. Podobnie na str. 80 Hirai i wsp. (2009), w spisie literatury jest tylko publikacja tych autorów z 2012 r.
- Brak jednolitego systemu cytowania artykułów w tekście. Nie są podawane ani w porządku alfabetycznym, ani według czasu opublikowania, co utrudnia nieco sprawdzanie źródła.
- Zauważalny jest kontrast między liczbą celów pracy a liczbą wniosków (3 cele – 8 wniosków). Sądzę, że wnioski powinny być sformułowane w sposób bardziej skondensowany i powinny bardziej korelować z celami.
- We wniosku 7. Autorka stwierdza, że efektywność zakażenia kawii domowych *per os* cyt: „zależy od wielu czynników m.in. od statusu immunologicznego zwierzęcia”. Na podstawie przeprowadzonych przez Doktorantkę badań nie można wysnuć takiego wniosku, ponieważ nie wykonywała badań określających kondycję immunologiczną zwierząt użytych w doświadczeniu.
- Wniosek 8 jest bardziej podsumowaniem badań.
- W streszczeniu na str. 89 widnieje informacja, że przeprowadzone doświadczenie „(...)nie wykluczyło możliwości transmisji patogenu drogą pokarmową”. Natomiast wniosek 7. głosi, iż wykazano, że „(...)możliwe jest wniknięcie *C. burnetii* do organizmu drogą alimentarną”. Warto byłoby ujednolicić treść wniosku i streszczenia.

- W streszczeniu, str. 87, w ostatnim zdaniu trzeciego akapitu należy zmienić „(...) 62% badanych mlek i produktów mlecznych (...)”, na „62% badanych próbek mleka i produktów mlecznych”.
- Streszczenie wydaje mi się trochę za długie. Powinno być ograniczone do najistotniejszych informacji.

Przedstawione uwagi krytyczne, mające w większości charakter porządkowy lub dyskusyjny nie umniejszają w znaczący sposób wartości recenzowanej rozprawy doktorskiej oraz nie mają fundamentalnego wpływu na jej pozytywną ocenę.

Reasumując, stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. wet. Agnieszki Jodełko pt. „Genotypowanie szczepów *Coxiella burnetii* występujących u bydła oraz ocena możliwości transmisji patogenu drogą alimentarną” spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595) oraz w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 26 września 2016 r. w sprawie szczegółowego trybu przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U. z 30.09.2016 poz. 1586), dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego wniosek o dopuszczenie lek. wet. Agnieszki Jodełko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnoszę też o wyróżnienie pracy, ponieważ uważam, że rozprawa doktorska lek. wet. Agnieszki Jodełko w sposób znaczący wzbogaca wiedzę na temat gorączki Q.

Olsztyn, 28.06.2018 r.

