

Ocena pracy doktorskiej lek. wet. Agnieszki Jodełko

pt.: „Genotypowanie szczepów *Coxiella burnetii* występujących u bydła oraz ocena możliwości transmisji patogenu drogą alimentarną” – wykonanej pod kierunkiem dr hab.

Krzysztofa Niemczuka, prof. nadzw. PIWet-PIB w Puławach oraz dr hab. Moniki Szymańskiej-Czerwińskiej, prof. nadzw. PIWet-PIB w Puławach (promotora pomocniczego) w Zakładzie Chorób Bydła i Owiec Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach.

Recenzję wykonano przyjmując zlecenie, którym jest pismo Komisji Doktorskiej Rady Naukowej z dnia 30.05.2018 r. (BRN-410/3/18), zgodne z Uchwałą Rady Naukowej PIWet-PIB podjętą w dniu 27.04.2016 r.

*Coxiella burnetii* po raz pierwszy wyizolowano w latach trzydziestych dwudziestego wieku z krwi ludzkiej. Jest zaliczana do patogenów obligatoryjnie wewnątrzkomórkowych. Specyfika morfologiczna tej pleomorficznej ziarniako-pałeczki warunkuje długotrwałą przeżywalność patogenu w środowisku pozakomórkowym oraz dużą odporność na działanie czynników fizyko-chemicznych. Wysoka zakaźność drogą aerogenną i długotrwała przeżywalność w środowisku stały się powodem sklasyfikowania *Coxiella burnetii*, jako potencjalnej broni biologicznej kategorii B.

*C. burnetii* - czynnik etiologiczny gorączki Q, zakaźnej i zaraźliwej choroby ludzi i wielu gatunków zwierząt, izolowano na całym świecie, z wyjątkiem Antarktyki i Nowej Zelandii. Rezerwuarem zarazka i głównym źródłem zakażenia dla ludzi jest bydło i małe przeżuwacze. Obecność przeciwciał anti-*C. burnetii* w krajach europejskich stwierdzano w surowicy krów w 20-48% stad. Niepokojąco wysoki odsetek zakażonych stad (84%) stwierdzono w Chinach. Na wyższy odsetek zakażeń wskazują badania obecności swoistych przeciwciał w mleku. W zakażonych stadach stwierdza się zmienny, lecz relatywnie wysoki odsetek przypadków siewstwa patogenu z mlekiem – od 20-52% w stadach krajów europejskich, do 94% w USA.

Dostępne dane o sytuacji epidemiologicznej i epizootologicznej są ograniczone w dużej części do zarejestrowanych przypadków zachorowań. Biorąc pod uwagę powszechność występowania tego patogenu u zwierząt można przypuszczać, że dane o występowaniu

gorączki Q u ludzi w Europie, w tym w Polsce są niedoszacowane. Przyczynia się do tego niespecyficzność objawów klinicznych towarzyszących zakażeniom, subkliniczny przebieg infekcji, sprzyjający endemicznemu rozprzestrzenianiu się bakterii w stadach bydła oraz trudności diagnostyczne. Z tych powodów zagrożenie, jakie może stwarzać *C. burnetii* jest niedostrzegane.

W tematykę szacowania skali zagrożenia stad bydła występowaniem *C. burnetii*, charakterystykę molekularną terenowych szczepów patogenu i ocenę ryzyka transmisji zakażeń drogą alimentarną wpisuje się przedłożona do oceny praca doktorska lek. wet. Agnieszki Jodełko pt.: „Genotypowanie szczepów *Coxiella burnetii* występujących u bydła oraz ocena możliwości transmisji patogenu drogą alimentarną” – wykonana w Zakładzie Chorób Bydła i Owiec Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach pod kierunkiem dr hab. Krzysztofa Niemczuka, prof. nadzw. PIWet-PIB w Puławach oraz dr hab. Moniki Szymańskiej-Czerwińskiej, prof. nadzw. PIWet-PIB w Puławach (promotora pomocniczego).

Pracę stanowi 139-stronicowe opracowanie wyników badań częściowo wykonanych w ramach projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki pt. „Występowanie i charakterystyka genotypowa krajowych szczepów *Coxiella burnetii* w stadach krów mlecznych oraz możliwości transmisji gorączki Q drogą alimentarną” nr 2015/17/D/NZ7/00816. Badania laboratoryjne wykonano w warunkach uwzględniających zagrożenie biologiczne patogenem, w laboratoriach II i III klasy bezpieczeństwa biologicznego PIWet-PIB w Puławach, w większości zgodnie z akredytowanymi procedurami badawczymi na zgodność z normą PN-EN ISO/IEC 17025:2005 oraz w Krajowym Laboratorium Referencyjnym ds. gorączki Q posiadającym status Laboratorium Referencyjnego Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (OIE).

Opracowanie zostało przygotowane według klasycznego sposobu opisu badań obejmującego podział treści na 10 rozdziałów, które stanowią: wstęp, cel pracy, materiał i metody, omówienie wyników, dyskusja, wnioski, streszczenia (w języku polskim i angielskim), piśmiennictwo (223 pozycje) oraz aneks z sześcioma załącznikami zawierającymi informacje o liczbie stad, rodzajach próbek materiału biologicznego badanych w poszczególnych województwach i wynikach uzyskanych metodą real-time PCR, wynikach badań serologicznych i molekularnych mleka oraz produktów mlecznych dostępnych w sprzedaży, porównanie wartości Ct uzyskanych w badaniu metodą real-time PCR z wartościami OD w teście ELISA, wyniki genotypowania metodą MLVA i MST oraz ich porównanie.

W rozdziale „Wstęp” (str. 9-25) znajduje się ogólna charakterystyka *C. burnetii*, krótki opis jej znaczenia epidemiologicznego, mechanizmów rozwoju zakażenia u zwierząt i ludzi, objawów klinicznych, metod i technik diagnostyki zakażeń oraz ich zwalczania i profilaktyki.

Kluczowymi uwagami uzasadniającymi cel podjętych badań (str. 26-27) jest wskazanie na brak szerszych danych nad występowaniem patogenu w krajowej populacji bydła oraz molekularnym zróżnicowaniem szczepów terenowych. Doktorantka zwraca uwagę, że *C. burnetii* jest patogenem zoonotycznym, stąd badania zwłaszcza bydła mlecznego są ważne zarówno w aspekcie ochrony zdrowia zwierząt, jak i ochrony zdrowia publicznego. Również próba ustosunkowania się do opinii o możliwej transmisji patogenu drogą pokarmową z wykorzystaniem modelu zwierzęcego (kawii domowej) jest zasadna wobec sprzecznych danych literaturowych na ten temat. Dlatego określenie poziomu seroprewalencji oraz prewalencji *C. burnetii* w stadach bydła w Polsce, scharakteryzowanie pod względem molekularnym szczepów terenowych patogenu z wykorzystaniem metod MLVA i MST oraz badania możliwości transmisji patogenu drogą pokarmową można uznać za ambitny i istotny problem badawczy.

W rozdziale „Materiał i metody” (str. 28-48) opisano etapy badań oraz szczegółowo opisano rodzaj materiału użytego do badań, liczbę stad i próbek poddanych badaniom serologicznym, molekularnym i genotypowaniu w każdym z województw, opisano metodykę tych badań, zastosowane w analizie wyników testy statystyczne, metodykę namnożenia szczepu Nine Mile fazy I dla potrzeb doświadczenia oraz opis eksperymentalnego zakażenia *per os* zwierząt doświadczalnych. Cały rozdział wraz ze szczegółowym opisem metod badań serologicznych, molekularnych i genetycznych wskazuje na bardzo dobre opanowanie umiejętności „warsztatowych” doktorantki, tak niezbędnych w realizacji badań epidemiologicznych.

W rozdziale „Wyniki” (str. 49-69) znajdujemy szczegółowy opis wyników badań serologicznych próbek surowicy, mleka i innych materiałów biologicznych pochodzącego od bydła oraz mleka i produktów mlecznych dostępnych w sprzedaży poddanych badaniom real-time PCR, genotypowaniu materiału genetycznego *C. burnetii* metodą MLVA i MST, a także wyników eksperymentalnego zakażenia *per os* zwierzęcia modelowego tj. kawii domowej. Uzupełnieniem rozdziału jest przedstawienie wyników w formie 9 tabel i graficzne na 10 rycinach wraz z niezbędnymi przypisami oraz opisem efektów badań statystycznych. Całość rozdziału prezentuje konsekwentnie realizowany „scenariusz” analiz zmierzających do udzielenia odpowiedzi na pytania wynikające z celów badań.

W podjętej dyskusji (str. 70-84) doktorantka podkreśla, że skutki infekcji to nie tylko straty ekonomiczne wynikające z zaburzeń w rozrodzie, ale przede wszystkim straty wynikające w chwili pojawienia się siewstwa *C. burnetii* wraz z mlekiem. Doktorantka wskazuje, że zgodnie z obowiązującym prawodawstwem, surowe mleko pochodzące od zwierząt wykazujących objawy choroby zakaźnej przenoszonej na człowieka przez mleko, powinno być traktowane, jako niespełniające wymagań rozporządzenia (WE) nr 853/2004 (pkt. 1a, rozdz. I sekcja IX zał. III) i być oceniane, jako nienadające się do produkcji środków spożywczych dla ludzi. Co więcej wskazuje, że w przypadku gospodarstw prowadzących działalność lokalną i ograniczoną do produkcji wyrobów z mleka niepasteryzowanego, ich dystrybucja powinna zostać zawieszona (wytyczne Głównego Lekarza Weterynarii z dnia 12 lutego 2016).

Szczególnie interesujące są przedstawione w dyskusji podsumowania analiz statystycznych. Po pierwsze w swojej pracy doktorantka wykazała wysoką 87% zgodność wyników badania zbiorczych próbek mleka uzyskanych metodą ELISA i real-time PCR, co potwierdza przydatność tego rodzaju materiału biologicznego do badań przesiewowych. Po drugie ustaliła na podstawie badania próbek z całego obszaru kraju (badaniami objęto wszystkie województwa), że 45,5% stad stwierdza się obecność przeciwciał anti-*C. burnetii* w mleku. Z przeprowadzonych badań wynika również, że istotnym problemem jest siewstwo *C. burnetii*, potwierdzone w 32% badanych stadach, ustalone nie tylko na podstawie badania materiału z wymazów z dróg rodnych i łożysk, lecz przede wszystkim mleka. Po trzecie na podstawie analizy danych z wywiadu i przeprowadzonych badań doktorantka ustaliła, że dominującym obrazem zakażeń bydła jest bezobjawowe siewstwo *C. burnetii*, w przeciwieństwie do małych przeżuwaczy, u których zakażenie zwykle skutkuje poronieniami. Jednym z najważniejszych założeń pracy, a zarazem bardzo pracochłonnym było genotypowanie terenowych szczepów *C. burnetii* metodami MLVA i MST. Pomimo istniejących ograniczeń obydwie metody z powodzeniem zostały zastosowane w prezentowanych badaniach. Efektem genotypowania techniką MLVA było zidentyfikowanie ośmiu genotypów *C. burnetii*, spośród których trzy jak dotychczas nie zostały opisane. Wykazano, że w populacji bydła w Polsce dominują dwa genotypy – I i J, najczęściej zidentyfikowane u bydła również na świecie. W jednym ze stad zidentyfikowano genotyp charakterystyczny dla szczepu referencyjnego Nine Mile RSA 493, powiązany z występowaniem ostrej postaci gorączki Q u ludzi, dotychczas nie wykrywany u bydła.

Genotypowanie z zastosowaniem metody MST, ze względu na nieco niższy potencjał różnicujący, wykazało mniejsze zróżnicowanie genotypów *C. burnetii*. O ile genotyp próbki

sklasyfikowanej metodą MLVA tożsamy ze szczepem Nine Mile RSA 493 został zaklasyfikowany metodą MST do 16 typu sekwencyjnego, to pozostałe szczepy, dla których udało się uzyskać pełen profil genotypowy, należały do 61 typu sekwencyjnego, co jest ważnym osiągnięciem wobec tylko jednej publikacji opisującej genotypowanie szczepów *C. burnetii* występującej w żywności. W prezentowanych badaniach odsetek produktów mlecznych, w których wykryto materiał genetyczny *C. burnetii* wyniósł 69,2%, co dowodzi powszechności występowania patogenu w mleku. Należy podkreślić, że wobec wzrostu konsumpcji mleka niepasteryzowanego oraz produktów z niego wytworzonych, badania mleka w kierunku obecności czynników zoonotycznych stanowi kluczowy element bezpieczeństwa żywności.

Poznawczym elementem badań było porównanie genotypów występujących u bydła w Polsce na przestrzeni lat. Z przeprowadzonych analiz wynika, że genotypy aktualnie stwierdzone w Polsce południowo-wschodniej, uważanej za obszar endemicznego występowania choroby, również stwierdzone w próbkach z innych regionów kraju są odmienne od tych, które występowały na tych terenach w minionym wieku. Zdaniem doktorantki wysokie podobieństwo między genotypami MLVA szczepów bydłych zidentyfikowanych w Polsce i innych krajach daje podstawę do przyjęcia hipotezy o klonalnym rozprzestrzenianiu się szczepów *C. burnetii* w populacji bydła na świecie. Co więcej grupowanie się szczepów z różnych państw uzyskanych od tego samego gatunku zwierząt, co jest szczególnie widoczne u bydła, sugeruje skłonności adaptacyjne poszczególnych gatunków *C. burnetii* do określonego gospodarza.

W łańcuch etiopatogenetyczny wpisują się również badania nad możliwością przenoszenia zakażenia drogą alimentarną, szczególnie wobec nieustalonej na ten temat opinii świata nauki i obserwowanej dużej częstości siewstwa patogenu wraz z mlekiem. Przeprowadzone badania dowodzą, że droga pokarmowa może być realnym szlakiem zakażenia. Powołując się na istniejące dane piśmiennictwa i wyniki badań własnych doktorantka stwierdza, że *C. burnetii*, jako czynnik zoonotyczny występując w mleku może stanowić zagrożenie zdrowia publicznego.

Rzeczowość i aktualność przeprowadzonych badań potwierdzają publikacje (str. 93-109), na które powołuje się doktorantka w dyskusji, wśród których znajdują się pozycje kluczowe i bardzo aktualne.

Opisane efekty badań doktorantka podsumowała ośmioma rozsądnie sformułowanymi, rzeczowymi i wyważonymi wnioskami (str. 85-86). Drobne wątpliwość może budzić uzupełniające wnioski siódmy zdanie, w którym doktorantka sugeruje, że zakażenie *per os*

nie w każdym przypadku jest efektywną drogą infekcji, co zależy od wielu czynników m.in. od statusu immunologicznego zwierzęcia, wobec braku badań własnych w tym zakresie.

Występując w roli recenzenta przedłożonego opracowania chcę podkreślić jasno sprecyzowane cele. Kolejne etapy realizacji badań, analiza wyników i ich opis odzwierciedlają konsekwentne poszukiwanie odpowiedzi na pytania związane z narzuconym sobie kierunkiem badań. O wartości przeprowadzonych badań świadczą dostrzegalne umiejętności „warsztatowe” pracy w laboratorium oraz niewątpliwie skala kompleksowych badań epidemiologicznych w zakresie oceny seroprewalencji połączonej z oceną siewstwa oraz genotypowaniem terenowych szczepów *C. burnetii* występujących w populacji bydła. Nie do przecenienia jest również eksperymentalna część badań, w której doktorantka podjęła próbę ustosunkowania się do rozbieżnych opinii o możliwej transmisji zakażeń drogą alimentarną, wobec bardzo dużej skali siewstwa patogenu do mleka. Niezwykle istotnym efektem badań, zwłaszcza w kontekście ochrony zdrowia publicznego, jest stwierdzenie w badanych próbkach genotypów oraz typów sekwencyjnych, które identyfikowano w innych krajach w materiale pochodzącym od ludzi z ostrą lub przewlekłą postacią gorączki Q.

Z obowiązku recenzenta muszę wskazać na dwa zagadnienia, na które zwrócono uwagę we wstępie, a nie znalazły „rozwinęcia”. Pierwsze z nich to zogniskowanie uwagi na fakcie, że u ludzi, u których występują swoiste przeciwciała, podanie szczepionki zawierającej komórki szczepu Henzerling fazy I może wywołać ciężkie reakcje poszczepienne. Stąd bezwzględna konieczność poprzedzenia szczepień wykonaniem testów śródskórnych i serologicznych. Czy istnieją doniesienia o podobnych zagrożeniach dla zwierząt? Drugie zagadnienie dotyczy transmisji zakażeń drogą pokarmową. Czy można oczekiwać zróżnicowania podatności na zakażenie drogą alimentarną wobec różnorodności genotypów i typów sekwencyjnych *C. burnetii*? Chcę jednak wskazać, że obie uwagi w niczym nie umniejszają jakości przygotowanego opracowania, lecz stanowią wskazówki możliwe do wykorzystania przy przygotowywaniu publikacji.

Przedstawione opracowanie wykonanych badań oceniam bardzo wysoko, a kierując się niezaprzeczalną wartością merytoryczną i aplikacyjną badań wnioskuję na właściwym etapie przewodu doktorskiego o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

Podsumowując ocenę pracy doktorskiej, doceniając zakres i wnikliwość badań, stopień trudności nakreślonych celów badań, a także wkład pracy w przygotowanie opracowania stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. wet. Agnieszki Jodełko pt.: „Genotypowanie szczepów *Coxiella burnetii* występujących u bydła oraz ocena możliwości transmisji patogenu drogą alimentarną” spełnia warunki określone w ustawie o stopniach

naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65 poz. 595 z 2003 r., ze zmianami w Dz.U. z 2005 r.) oraz § 6 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22 września 2011 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadaniu tytułu profesora (Dz. U. Nr 204, poz. 1200).

W związku z powyższym przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie lek. wet. Agnieszki Jodełko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



.....  
Dr hab. n. wet. Marek Gehrke  
prof. nadzw. UMK w Toruniu