

Prof. dr hab. Joanna Szteyn

10-769 OLSZTYN

Ocena

pracy doktorskiej mgr Eweliny Bigoraj wykonanej w Zakładzie Wirusologii Żywności i Środowiska Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

**Tytuł pracy: „Wirus zapalenia wątroby typu E (HEV) w żywności pochodzenia
zwierzęcego”**

Promotor: prof. dr hab. Artur Rzeszutka

Promotor pomocniczy: dr Ewa Kwit

Podstawa formalna

Zgodnie z Uchwałą Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego- Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach podjętej w dniu 13.12.2017 r, zostałam powołana na recenzenta w/w rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Bigoraj. Badania będące podstawą opublikowanych trzech prac oryginalnych i jednej publikacji przeglądowej, stanowiących rozprawę doktorską sfinansowane zostały ze środków dotacji KNOW-Konsorcjum Naukowe „Zdrowe Zwierzę - Bezpieczna Żywność” nr 05-1/KNOW2 /2015.

Ocena formalna

Pracę doktorską mgr Eweliny Bigoraj stanowi cykl czterech publikacji z których pierwsza opublikowana w 2017 r jest pracą przeglądową o IF= 0,197. Pozostałe trzy, są pracami oryginalnymi o łącznym IF 11,724. Łączna uzyskana punktacja, według : listy czasopism punktowanych MNiSW wyniosła 215, a IF 11,921 według *Journal Citation Reports*, zgodnie z rokiem opublikowania. Tematyka rozprawy doktorskiej jest ściśle związana z obszarem zainteresowań pracowników Zakładu Wirusologii Żywności i Środowiska PIW-

PIB i dotyczy wirusa zapalenia wątroby typu E (HEV). Temat pracy wpisuje się w strategię zarówno Światowej Organizacji Zdrowia „One life one liver” jak i pozarządowej organizacja World Hepatitis Alliance zakładającej zwiększenie intensywności działań prowadzących do wyeliminowania do 2030 r. wirusowego zapalenia wątroby jako zagrożenia dla zdrowia publicznego. Dlatego badanie różnych źródeł zakażenia wirusem HEV człowieka jest tak istotne, Pani mgr Ewelina Bigoraj miała znaczący udział w: wyborze tematu, opracowywaniu koncepcji badań, planowaniu doświadczeń, wykonywaniu oznaczeń laboratoryjnych a także opracowaniu i interpretacji wyników badań laboratoryjnych oraz przygotowaniu manuskryptów przed wysłaniem ich do druku. Opublikowana praca przeglądowa, której Doktorantka jest pierwszy autorem powstała przy Jej współudziale w wypracowaniu koncepcji artykułu, zrobieniu kwerendy, zebraniu literatury, przygotowaniu manuskryptu, korekcie tekstu przed ostatecznym opublikowaniem.

Recenzowana praca doktorska posiada klasyczny układ, czyli wyodrębniony: wstęp, cele pracy, materiał i metody oraz omówienie głównych wyników prac doświadczalnych. Pracę kończy sześć wniosków. Wstęp poprzedzony jest wykazem publikacji składających się na rozprawę doktorską i listą używanych w tekście skrótów. Na końcu pracy umieszczono streszczenie w języku polskim i angielskim .

Ocena merytoryczna

Tytuł rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Bigoraj jest jasno sformułowany lecz nie jest odzwierciedleniem całości dokonań Doktorantki. W bardzo obszernym wstępie wykazuje Autorka dobrą znajomość zagadnień ogólnych związanych z taksonomią wirusa HEV i genetycznym pokrewieństwem szczepów wykrywanych u ludzi i różnych gatunków ssaków będących żywicielami tego patogenu. Przedstawia szczegóły organizacji genomu HEV i etapy jego replikacji w komórkach gospodarza zwracając baczną uwagę na funkcje białek strukturalnych i niestrukturalnych wirionu. Kolejną część wstępu poświęca epidemiologii zakażeń u ludzi i ich występowania u zwierząt gospodarskich i dziko żyjących. Podkreśla fakt zróżnicowania genetycznego HEV czyli występowania 8 genotypów i szeregu podtypów, z których część nie wykazuje potencjału zoonotycznego, a jednocześnie reprezentuje ten sam serotyp. Następne dwa zagadnienia omawiane przez Autorkę Dysertacji to udokumentowane przykłady żywności, zarówno pochodzenia zwierzęcego jak i pochodzenia roślinnego będącej źródłem zakażenia człowieka HEV. Wstęp kończą informacje o przypadkach wykrywania HEV na różnych etapach produkcji żywności, gdzie szczególną rolę przypisuje się etapowi produkcji

pierwotnej w tym hodowli zwierząt rzeźnych i hodowli mięczaków. Rozległy wstęp oparty na 247 pozycjach cytowanej literatury oraz publikacja artykułu przeglądowego świadczą o dobrym przygotowaniu Doktorantki do pracy badawczej w zakresie dyscypliny którą reprezentuje. Mgr Ewelina Bigoraj sformułowała cztery główne cele pracy doktorskiej. Pierwszym i podstawowym dla dalszych badań celem było adaptowanie i zastosowanie komercyjnie dostępnego zestawu ELISA (ludzkiego) recomWell HEV IgG (Mikrogen Diagnostik, Niemcy) do wykrywania zakażeń HEV u królików. Szczegóły metodyczne przystosowania testu i jego walidacji opisała Doktorantka w artykule opublikowanym w czasopiśmie Food Analytical Methods. Kolejne sformułowane cele pracy doktorskiej to :

- II .Ocena występowania zakażeń HEV u królików rzeźnych oraz identyfikacja zoonotycznych genotypów wirusa
- III. Wykrywanie i ilościowa ocena zawartości HEV we krwi i wątrobie wieprzowej stanowiących surowiec do produkcji wędlin podrobowych
- IV. Znaczenie obecności adenowirusa świń (pAdV) w żywności jako higienicznego wskaźnika jej zanieczyszczenia enterowirusami

Dane literaturowe wskazujące na występowanie zakażeń wirusem zapalenia wątroby typu E człowieka (HEV) w hodowlach królików i u ludzi, a brak informacji o występowaniu HEV w hodowlach krajowych królików skłoniły Doktorantkę do przeprowadzenia badań nad rozpowszechnieniem wirusa w rodzimych hodowlach tego gatunku zwierząt. Próbki do badań, krew i wątroby pobierano na etapie uboju królików różnych ras w wieku od 2,8 do 6 miesięcy. Zwierzęta pochodziły z 20 małych oraz 4 wielkoobszarowych gospodarstw. Wykrywanie przeciwciał anti-HEV przeprowadzono testem ELISA, a wykrywania HEV i wirusa kontroli procesu metodą RT-PCR. Identyfikację genotypów i podtypów wyizolowanych króliczych HEV wykonano poprzez amplifikację fragmentu genomu wirusa ORF2, a otrzymane amplikony PCR oczyszczono i zsekwencjonowano. Uzyskane sekwencje nukleotydowe poszczególnych fragmentów króliczych szczepów HEV porównywano z sekwencjami wirusów dostępnymi w GenBank. Analiza statystyczna (test T-studenta) wykazała różnice w występowaniu zakażeń HEV u królików pochodzących z małych i dużych komercyjnych ferm. Przeciwciała anti-HEV wykryto w 6% badanych próbek króliczych. Badanie 29 surowic w których wykryto przeciwciała, nie potwierdziły obecności HEV-RNA w 28, a trzy surowice w których wykryto HEV-RNA nie wykazały obecności przeciwciał swoistych dla wirusa.. Wszystkie króliki w surowicy których stwierdzono obecność przeciwciał IgG pochodziły z

hodowli przydomowej, nie stwierdzono przeciwciał w surowicach królików z hodowli wielkostadnej. Inne rezultaty uzyskano z badania próbek wątroby, od tych samych królików. Wirusowe RNA wykryto w 72 wątrobach, co stanowiło 14,9% badanych, w 58 próbkach z tej grupy miana przeciwciał były zbyt niskie żeby uznać je za seropozytywne. Analiza statystyczna (Person) nie potwierdziła zależności pomiędzy wynikami testu ELISA i PCR na częstość występowania zakażeń HEV u królików z ferm o różnej skali hodowli. Autorka sugeruje jednak, na podstawie analizy rangi Spearmana i testu X^2 , że badania większej liczby zwierząt mogłyby potwierdzić korelację między wynikami serologicznymi i molekularnymi. Dla określenia genotypów sześćdziesięciu czterech szczepów amplifikowano regionu ORF2 i ośmiu szczepów regionu ORF 2/3. Analiza filogenetyczna sekwencji ORF2 króliczych szczepów HEV i szczepów ludzkich, świńskich i pozyskanych od dzików, pozwoliła na ich afiliację do HEV gt3 podtyp ra. Szczepy HEV wyizolowane od królika pogrupowano w trzy genetycznie odrębne klady. Homologia sekwencji między szczepami królików była znaczna i wynosiła od 62% do 97%. Najwyższą homologię sekwencji 99-100% zaobserwowano wśród szczepów wyizolowanych od zwierząt z jednego powiatu. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki badania próbek krwi i wątroby pobranych od królików poddawanych ubojowi potwierdzają występowanie w nich wirusa zapalenia wątroby typu E- HEV. Uzyskane wyniki mają wymiar praktyczny i powinny stać się podstawą, przy dopuszczaniu mięsa króliczego do spożycia, zastosowania dwóch generalnych zasad prawa żywnościowego takich jak : analiza ryzyka (art. 6. Rozporządzenia WE 178/2002) i zasady ostrożności (art. 7 Rozporządzenia WE 178/2002) dla zapewnienia wysokiego stopnia bezpieczeństwa żywności.

Kolejne dwa cele dysertacji, wskazane przez Doktorantkę, omówiony został w artykule opublikowanym na łamach Food and Environmental Virologii. Do oceny występowania wirusa zapalenia wątroby typu E człowieka (HEV) i adenowirusa świńskiego pAdV Doktorantka przebadła próbki wątroby i krwi spożywczej świń. Próbki wątrób wieprzowych pozyskiwano na etapie handlu detalicznego z różnych partii dostarczanych do sklepów w latach 2016-2018, natomiast próbki krwi pozyskiwano w trakcie uboju w dwóch rzeźniach w latach 2018 i 2019. Przed pobieraniem próbek opracowany był schemat ich pozyskiwania, uwzględniający wiek zwierząt i wielkość stada. Do wykrywania materiału genetycznego HEV i adenowirusa świńskiego zastosowano metodę duplex real-time RT-qPCR i real-time PCR. Obecność RNA HEV stwierdzono tylko w 3,4% próbek krwi i w 1% próbek wątroby, a adenowirusa świńskiego pAdV nie wykryto zastosowanymi metodami w żadnej z próbek wątroby, natomiast wykryto w 13% badanych próbek krwi spożywczej. Podobnie jak w przypadku badania szczepów

izolowanych od królików szczepy izolowane od świń dla określenia genotypów poddano amplifikacji. W przypadku wyizolowanych szczepów świńskich HEV amplifikowano region ORF2, a dla identyfikacji serotypu pAdV fragment genu kodującego białko heksonu. Identyfikację serotypów pAdV przeprowadzono na podstawie dopasowanie ich sekwencji z sekwencjami referencyjnymi ludzkich i zwierzęcych adenowirusów reprezentujących różne serotypów dostępnych w GenBanku. Wykonano analizy za pomocą BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Cztery z wyizolowanych HEV zakwalifikowano do podtypu wirusa 3f i jeden do podtypu 3e. Sekwencje nukleotydowe wszystkich szczepów pAdV należały do serotypu 5. Przeprowadzone przez Doktorantkę badanie występowania HEV w próbkach wątrób i krwi wieprzowej wykazały sporadyczne jego występowanie u tego gatunku zwierząt. Analiza w kierunku występowania adenowirusa świńskiego pAdV nie pozwoliła na jego wykrycie w próbach świńskich wątrób, był obecny w krwi spożywczej.

Autorka na podstawie badań opracowała 5 wniosków z których pierwszy i drugi są sformułowane jasno i potwierdzają udowodnioną przydatność zmodyfikowanego testu ELISA, przeznaczonego do wykrywania przeciwciał anty HEV u ludzi, do wykrywania przeciwciał u królików. Wniosek trzeci cyt. „Infekcje HEV u królików w Polsce występują u zwierząt w hodowlach drobotowarowych” uważam za zbyt uogólnienie, ponieważ Doktorantka nie zbadała wszystkich hodowli królików jakie są w Polsce, dodatkowo wykorzystwała tylko dwie metody wykrywania HEV. Częściowo zgadzam się z wnioskiem czwartym ponieważ rzeczywiście narządy i tkanki królików i świń mogą zawierać HEV, lecz ryzyko zanieczyszczenia (zainfekowania) tkanek królików jest wyższe niż u świń i można było to wyartykułować w drugiej części wniosku. W kolejnym, piątym wniosku, Doktorantka użyła sformułowania „w żywności pochodzenia zwierzęcego”, co jest skrótem myślowym często powielanym. Badania obejmowały tylko krew i wątrobę a zatem podroby, które nie są zasadniczymi surowcami do produkcji żywności zwierzęcego pochodzenia. Wniosek szósty miał być odpowiedzią na zamieszczony we wstępie czwarty cel pracy i powinien odnosić się tylko do wykonanych badań. Pani mgr Ewelina Bigoraj próby wątrób pobierała do badań w sklepach detalicznych w latach 2016-2017, a próbki krwi w rzeźniach w roku 2018 i 2019. Jaki zatem sposób, czy metodę zastosowała do powiązania sposobu żywienia i utrzymania zwierząt z próbkami poddanymi badaniu.

Z obowiązku recenzenta chciałabym zwrócić uwagę Doktorantki na pewne wątpliwości i sugestie: Pierwsza odnosi się do samego tytułu Dysertacji który nie uwzględnia ważnej części metodycznej. W tytule używa Pani sformułowania „w żywności zwierzęcego pochodzenia”, a

badania wykonała tylko z użyciem krwi i wątrób dwóch gatunków zwierząt rzeźnych. Czy zatem jest uzasadnione takie uogólnienie? W podrozdziale publikacji II/3 „-Próbki krwi spożywczej i wątroby” w pierwszym zdaniu czytamy: Ogólnie 246 prób wątroby (n=100). Czy badane i uwzględniane w obliczeniach statystycznych były 246 próby czy 100? Kolejna wątpliwość i pytanie związane jest z liczbą tuczników w wieku 5-6 miesięcy które zgodnie z tekstem stanowiły 99,77 % świń od których pobierano próby. Czy zatem włączenie pozostałych zwierząt stanowiących tylko 0,3% znacznie odbiegających wiekiem i ciężarem uważa Doktorantka za uzasadnione, a jeśli tak to dlaczego?

Ocena końcowa

Wyrażone wątpliwości nie pomniejszają wartości poznawczych i aplikacyjnych pracy mgr Eweliny Bigoraj. Bardzo dobra znajomość literatury dotycząca wirusa zapalenia wątroby typu E, rozległa wiedza w zakresie omawianych zagadnień, przeprowadzenie skomplikowanych oznaczeń, wykorzystanie narzędzi bioinformatycznych do określenia genotypów oraz umiejętność wnioskowania świadczą o dobrym naukowym przygotowaniu Doktorantki. Pani mgr Ewelina Bigoraj zrealizowała postawione cele badawcze oraz wniosła nowe treści poznawcze i użyteczne do stanu wiedzy o HEV. W świetle powyższej oceny formalnej i merytorycznej oraz treści pracy doktorskiej mgr Eweliny Bigoraj stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 Stycznia 2018r w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U. 2018 poz. 261). W związku z powyższym, stawiam wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Bigoraj oraz dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


prof. dr hab. Joanna Sztejn