

Warszawa 24.08.2023 r.

Prof. dr hab. Krzysztof Anusz

Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego

Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Bigoraj
pt. "Wirus zapalenia wątroby typu E (HEV) w żywności pochodzenia zwierzęcego"
wykonanej w Zakładzie Wirusologii Żywności i Środowiska PIWet-PIB w Puławach
pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Artura Rzeżutki**

oraz promotora pomocniczego dr Ewy Kwit

Podstawę formalną do wykonania recenzji pracy doktorskiej mgr Eweliny Bigoraj stanowi uchwała Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach z dnia 12.12.2017 r.

Rozprawę doktorską autorstwa mgr Eweliny Bigoraj pt. "Wirus zapalenia wątroby typu E (HEV) w żywności pochodzenia zwierzęcego" stanowią 4 publikacje – w tym 1 przeglądowa i 3 oryginalne. Prace zostały opublikowane w 2017, 2018, 2020 i 2021 r w czasopismach z listy czasopism punktowanych MNiSW/MEN z Impact Factor według Journal Citation Reports zgodnie z rokiem opublikowania. Łączna punktacja powyższych publikacji wynosi 215 punktów, a łączny IF - 11,921. Prace uzyskały pozytywne recenzje. Także według mojej opinii prezentują bardzo wysoki poziom naukowy, redakcyjny i edytorski. Do rozprawy doktorskiej dołączono odpowiednie oświadczenia współautorów.

Praca przeglądowa opublikowana w 2017 r. w Medycynie Weterynaryjnej w sposób bardzo dokładny, a jednocześnie bardzo zwięzłe, przedstawia na podstawie literatury światowej problem wirusowego zapalenia wątroby typu E u ludzi, u zwierząt gospodarskich oraz u zwierząt związanych ze środowiskiem sylwatyicznym. Jest to doskonałe wprowadzenie do analizy trzech prac oryginalnych podejmujących odpowiednio tematykę zastosowania po adaptacji testu ELISA przeznaczonego do diagnostyki HEV u człowieka, do wykrywania przeciwciał anti-HEV w surowicy królików; wykrywania wirusa zapalenia wątroby typu E u królików rzeźnych; krwi i wątroby świńskiej jako

źródeł wirusa zapalenia wątroby typu E w procesie produkcyjnym produktów z podrobów wieprzowych.

Według mojej opinii, szczególnie istotne jest, że powyższe publikacje przyczyniają się do rozwoju diagnostyki laboratoryjnej zanieczyszczeń produktów spożywczych HEV. Doktorantka słusznie podkreśla, że żywność zawierająca wirusy nie zmienia swoich właściwości organoleptycznych. O rozpoznaniu zanieczyszczeń wirusowych decydują wyniki badań laboratoryjnych. Wirusologia żywności to bardzo rozwojowa dziedzina nauki.

Żywność pochodzenia zwierzęcego jest głównym źródłem zakażenia człowieka HEV. Mięso, krew, narządy ze szczególnym uwzględnieniem wątroby, od bezobjawowo zakażonych świń, dzików, królików i innych gatunków zwierząt będących rezerwuarem wirusa, stanowią materiał do przygotowywania żywności. Dla szczepów HEV o genotypie 3 i 4 główną drogą przeniesienia wirusa na człowieka jest droga pokarmowa. Groźne są również wodnopochoodne zakażenia przez HEV o genotypie 1 i 2. Zakażenia HEV są szczególnie groźne dla osób z obniżoną odpornością, chorobami współistniejącymi, dla nosicieli HIV, dla kobiet ciężarnych. U tych osób występują objawy wynikające z ostrego zapalenia wątroby.

Tytuł pracy został sformułowany prawidłowo i jest adekwatny do prezentowanej w czterech publikacjach tematyki. Dotychczas w Polsce nie prowadzono intensywnych badań zarówno występowania zakażeń HEV u zwierząt będących źródłem żywności dla człowieka, jak i w żywności pochodzenia zwierzęcego. W naszym kraju tak pogłębione badania mają charakter pionierski. Dodatkowo mamy do czynienia z bardzo trudną sytuacją w zakresie prewencji, diagnostyki laboratoryjnej i zwalczania zakażeń HEV u zwierząt produkujących żywność, przede wszystkim ze względu na ich bezobjawowy charakter i nie odnotowywanie strat ekonomicznych w ich następstwie. W tym zakresie koncepcja „Jedno Zdrowie” jest realizowana w znikomym zakresie. Podwyższa to dodatkowo wartość i rolę przeprowadzonych przez Doktorantkę badań.

Doktorantka we wstępie do pracy przedstawiła na podstawie literatury światowej informacje odnoszące się generalnie do herpeswirusów u ludzi i zwierząt, a następnie, przechodząc do zagadnień

związanych z HEV, organizację genomu i replikację tego wirusa w komórce, epidemiologię zakażeń HEV u człowieka, występowanie zakażeń HEV u zwierząt gospodarskich, z uwzględnieniem trzody chlewnej, królików, owiec, kóz, bydła, koni, jaków, drobiu domowego, występowanie zakażeń HEV u zwierząt dziko żyjących z uwzględnieniem dzików, zwierzyny płowej, szczurów i myszy.

Omawiając występowanie HEV u zwierząt dziko żyjących skoncentrowała się między innymi na możliwości wystąpienia przeniesienia zakażenia z dzików na świnie oraz dziko żyjące przeżuwacze. Pozostałe zagadnienia uwzględnione we wstępie to: HEV jako patogen wywołujący zoonozę, z zaznaczeniem, że przeciwciała anti-HEV IgG są częściej wykrywane wśród hodowców świń, lekarzy weterynarii i pracowników leśnych, czyli osób zawodowo narażonych na kontakt ze zwierzętami; udział żywności pochodzenia roślinnego w przenoszeniu HEV na człowieka z uwzględnieniem mrożonych malin, sałaty, szpinaku, rukoli, truskawek oraz ziół; wykrywanie HEV na poszczególnych etapach produkcji żywności metodami molekularnymi, między innymi ukierunkowanymi na wykrywanie materiału genetycznego wirusowych wskaźników zanieczyszczenia żywności (adenowirusy przewodu pokarmowego człowieka i świń, polyoma wirusy).

Doktorantka w podsumowaniu wstępu zwraca uwagę na rekomendację EFSA dotyczącą konieczności opracowania metod badawczych wykrywania i ilościowego oznaczania HEV w żywności, jak również umożliwiających identyfikację zoonotycznych genotypów i podtypów HEV u zwierząt. Powyższa rekomendacja przyświecała określeniu czterech, precyzyjnie sformułowanych celów pracy doktorskiej, obejmujących zarówno zagadnienia oceny występowania zakażeń HEV u królików z zastosowaniem adaptowanego komercyjnego testu ELISA oraz identyfikację zoonotycznych genotypów wirusa, jak i wykrywanie i ilościową ocenę zawartości HEV we krwi i wątrobie wieprzowej stanowiących surowiec do produkcji wędlin podrobowych, czy też znaczenie obecności adenowirusa świń (pAdV) w żywności jako higienicznego wskaźnika zanieczyszczenia enterowirusami.

Bardzo pozytywnie oceniam niezwykle syntetycznie sformułowany rozdział „Materiał i metody”, przedstawiający zagadnienia metodyczne odnoszące się do trzech publikacji oryginalnych, które wraz z publikacją przeglądową stanowią pracę doktorską. Przedstawiono w nim: próbki użyte do

badan – 482 pary próbek krwi i wątrób królików poddanych ubojowi, pochodzących z hodowli drobnotowarowej oraz 146 zbiorczych próbek krwi świńskiej i 100 wątrób wieprzowych; metodę serologicznej oceny występowania zakażeń HEV u królików – komercyjny test ELISA recomWell HEV IGG (Mikrogen Diagnostyk, Niemcy) do wykrywania swoistych przeciwciał anti-HEV w surowicy człowieka (płytki opłaszczane rekombinowanym białkiem O2 kapsydu szczepów HEV człowieka o genotypie 1 i 3), poddany modyfikacji i optymalizacji – zastąpienie koniugatu zawartego w zestawie (przeciwciała anti-człowiek IgG) białkiem A wykazującym reaktywność z przeciwciałami klasy Ig G człowieka i królika; odpowiednie procedury analiz molekularnych (wykrywanie HEV RNA w próbkach żywności – duplex real-time RT-qPCR; wykrywanie materiału genetycznego kaliciwirusa kotów (FCV) stanowiącego kontrolę procesu analizy próbki - jednostopniowy real-time RT PCR; identyfikacja DNA adenowirusa świń (pAdV) w żywności – real-time PCR; identyfikacja genotypu i podtypu wykrytych szczepów HEV świni i królika – analiza sekwencji nukleotydowych fragmentu ORF 2/3 w genomie HEV; metody analizy statystycznej. Użyty arsenał metod jest imponujący, pozwalający na osiągnięcie w pełni wiarygodnych wyników. Doktorantka wykazała się najwyższym zaawansowaniem metodycznym, które pozwoliło na osiągnięcie bardzo wartościowych wyników w odniesieniu do każdej z trzech publikacji oryginalnych, stanowiących wraz z publikacją przeglądową pracę doktorską.

Sukcesem zakończyły się prace nad adaptacją komercyjnie dostępnego testu ELISA przeznaczonego do wykrywania swoistych przeciwciał anti-HEV w surowicy człowieka do identyfikacji zakażeń HEV u królików. Badania próbek surowic od 482 królików przeprowadzone tym testem wykazały przeciwciała anti-HEV IgG w 29 próbkach (6%). Natomiast badania obecności wirusowego RNA w 482 próbkach wątrób od tych samych królików, wykazały ją w 72 próbkach (14,9%). Analiza badań serologicznych (ELISA) i molekularnych (PCR) nie wykazała istotnych różnic w częstości występowania HEV u królików z ferm drobno- i wielkotowarowych. Analiza filogenetyczna króliczych szczepów HEV przeprowadzona w oparciu o sekwencje nukleotydowe fragmentów ORF 2 i ORF 2/3 wykazała, że krajowe szczepy wirusa należą do genotypu 3, króliczego

podtypu ra. Sekwencje króliczych szczepów HEV w obrębie ORF 2 posiadały wzajemne podobieństwo w zakresie 88,8%-100%.

Badania molekularne występowania HEV i adenowirusów świń (pAdV) we krwi spożywczej i wątrobie wieprzowej – w surowcach do produkcji wędlin podrobowych, wykazały obecność HEV zarówno we krwi, jak i w wątrobach wieprzowych (podtyp „e” i „f” w obrębie genotypu 3). Natomiast obecność adenowirusa świńskiego stwierdzono jedynie we krwi spożywczej. Zidentyfikowane szczepy pAdV należały do serotypu 5 w grupie adenowirusów wywołujących zakażenia układu oddechowego, a nie pokarmowego świń.

Na podstawie powyższych wyników badań doktorantka sformułowała sześć jasnych, syntetycznych, wzorowo zredagowanych, w pełni uzasadnionych wniosków. Bardzo wartościowe wnioski 1, 2, 3 odnoszą się do udanej adaptacji komercyjnie dostępnego testu ELISA przeznaczonego do wykrywania swoistych przeciwciał anti-HEV w surowicy człowieka do identyfikacji zakażeń HEV u królików. Natomiast znaczenie fundamentalne, uświadamiające ogromne zagrożenie zdrowia publicznego mają wnioski czwarty i piąty, jednoznacznie informujące, że narządy i tkanki królików i świń pozyskane do celów spożywczych mogą zawierać HEV, a szczepy HEV wykryte w żywności pochodzenia zwierzęcego należą do grupy zoonotycznych szczepów wirusa o genotypie 3. Niezwykle ważny z punktu widzenia oceny zanieczyszczeń wirusowych żywności (wskaźnik zanieczyszczenia enterowirusami) jest wniosek szósty informujący, że wykazanie obecności adenowirusów świń w żywności pochodzenia zwierzęcego bez identyfikacji serotypów ma znikomą wartość prognostyczną - w tym miejscu należy przypomnieć, że powyższy wniosek został sformułowany przez Doktorantkę po zidentyfikowaniu serotypu 5 pAdV, wywołującego zakażenia układu oddechowego, a nie pokarmowego świń.

Nie mam uwag merytorycznych zarówno do syntetycznego opisu czterech publikacji stanowiących rozprawę doktorską, jak i do samych publikacji. Syntetyczny opis może być wzorem do przygotowywania tego typu opracowań.

Pragnę podkreślić bardzo wysoką jakość redakcyjną i edytorską przedstawionego do oceny opracowania wraz z publikacjami. Nie był to główny cel mojej oceny, ale nie odnotowałem w tym zakresie jakichkolwiek błędów, niepoprawności. Rozprawa doktorska mgr Eweliny Bigoraj jest przygotowana bardzo starannie, w czym zapewne znaczny udział ma również promotor i promotor pomocniczy.

Przedłożona do recenzji rozprawę doktorską oceniam bardzo pozytywnie. Według mojej opinii rozprawa doktorska mgr Eweliny Bigoraj pt. "Wirus zapalenia wątroby typu E (HEV) w żywności pochodzenia zwierzęcego" stanowi oryginalne i wartościowe opracowanie pod względem naukowym i aplikacyjnym. Publikacje, które stanowią rozprawę doktorską przyczyniają się do rozwoju wirusologii żywności. Jestem pod wrażeniem profesjonalizmu metodycznego Doktorantki. Wnioski sformułowane przez doktorantkę mają ogromne znaczenie dla ochrony zdrowia publicznego realizowanej zgodnie z koncepcją „Jedno Zdrowie”. W związku z powyższym wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Bigoraj, zgodnie z zapisami Regulaminu wyróżnienia rozpraw doktorskich Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach.

Uważam, że recenzowana przeze mnie rozprawa doktorska odpowiada warunkom określonym w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz. U. 2003 nr 65 poz. 596 z późn. zm.). W związku z powyższym zwracam się do Komisji Doktorskiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach z wnioskiem o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK KATEDRY

/ Prof. dr hab. Krzysztof Anusz /