



## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Anny Nowakowskiej

**„Wykrycie gorączki krwotocznej z zespołem nerkowym ludzi w Polsce w latach 2004-2018 oraz badania nad jej występowaniem i charakterystyką”**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Anny Nowakowskiej, została przeprowadzona pod kierownictwem prof. dr. hab. n. med. Józefa Piotra Knapa w Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego.

Praca z zakresu mikrobiologii środowiskowej i epidemiologii zakażeń ortohantawirusowych ludzi poświęcona jest opracowaniu schematu diagnostycznego hantawirusowej gorączki krwotocznej z zespołem nerkowym (HFRS) opartego na zwalidowanych analizach serologicznych oraz wprowadzeniu w schemat diagnostyczny epidemiologicznych badań ankietowych własnego pomysłu, umożliwiających ujawnienie istotnych parametrów epidemiologicznych jedynej rodzimej gorączki krwotocznej występującej w Polsce.

Badania wykonane w pracy doktorskiej finansowane były ze środków budżetowych dwóch projektów statutowych MNiSW: nr N N404 02043636 pt. „Badanie seroepidemiologiczne i kliniczne nad występowaniem zakażeń hantawirusowych (HFRS - gorączka krwotoczna z zespołem nerkowym) u ludzi Lubelszczyzny i nad ich przenosicielami”, nr N N308 091937 pt. „Występowanie zakażeń hantawirusowych w rezerwuarze zwierzęcym w aspekcie przypadków zachorowań u ludzi w województwie podkarpackim” realizowane w Instytucie Medycyny Wsi w Lublinie, w Wojskowym Instytucie Higieny i Epidemiologii w Puławach oraz w Laboratorium Diagnostyki Medycznej Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Rzeszowie.

Gorączka krwotoczna z zespołem nerkowym jest odzwierzęcą chorobą wywołaną przez hantawirusy należące do nowo utworzonego rzędu *Bunyavirales* i rodziny *Hantaviridae*. Do zakażenia człowieka dochodzi najczęściej drogą powietrzną np. poprzez

wdychanie kurzu pochodzącego z odchodów gryzoni wśród których wyróżnić można nornicę rudą, nornika polnego, myszarkę polną, myszarkę leśną. HFRS jest jedną z postaci klinicznych zakażeń ortohantawirusowych typowych dla zakażeń ludności Europy i Azji. Stąd ludność Polska szczególnie w miejscach endemicznego występowania wirusa (województwo podkarpackie) jest zagrożona infekcjami hantawirusowymi, w przebiegu których objawy niewydolności nerek są głównym wskaźnikiem klinicznym zachorowania. W Polsce do 2004 roku nie rozpoznano gorączki krwotocznej z zespołem nerkowym. Stąd też, wykrycie pierwszego przypadku HFRS w Polsce przez zespół badawczy pod kierownictwem wybitnego lekarza - epidemiologa, profesora dr. hab. n. med. Józefa, Piotra Knapa zainicjował cykl badań wpisujących się w główną oś założeń przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej.

Celem pracy doktorskiej Pani mgr Anny Nowakowskiej było wykrycie występowania rodzimych przypadków zakażeń ortohantawirusami i wdrożeniem badań nad wykryciem i charakterystyką wirusologiczną, kliniczną i epidemiologiczną badanych zakażeń w Polsce w latach 2004-2018. Celem pracy było również określenie udziału hantawirusów DOBV i PUUV w przypadkach zachorowań na gorączkę krwotoczną z zespołem nerkowym oraz przedstawienie cech charakterystycznych przebiegu klinicznego osób hospitalizowanych w latach 2004-2018, a także opracowanie wstępnej analizy sytuacji epidemiologicznej zakażeń ortohantawirusowych ludzi na terenach objętych badaniami wraz z próbą ich ekstrapolacji na sytuację endemiczną w Polsce.

Układ pracy w formalnej ocenie jest typowy dla rozprawy doktorskiej i składa się z części teoretycznej i części badawczej. Przedstawiona do recenzji praca doktorska obejmuje 206 stron maszynopisu, włącznie ze spisem treści, wykazem skrótów, oznaczeń i terminologii, spisem 45 rycin, spisem 31 tabel, spisem 4 załączników, słowami kluczowymi jak i streszczeniem w języku polskim i angielskim, wstępem, celem pracy, materiałami i metodami badań, wynikami, dyskusją, wnioskami i listą 185 pozycji piśmiennictwa głównie anglojęzycznego. Praca jest prawidłowo zorganizowana w rozdziały i podrozdziały dając przejrzysty obraz opisywanych zagadnień. Tekst jest napisany z dużą starannością językową i stylistyczną umożliwiając zrozumiały odbiór przekazywanej treści.

Opracowanie części teoretycznej dysertacji jest kompleksowe i bardzo szczegółowe. Obejmuje rozliczne podrozdziały opisujące zagadnienia dotyczące zarówno czynnika

etiologicznego zakażeń ortohantawirusowych: przynależność taksonomiczna, historia identyfikacji hantawirusów, budowa wirionu i organizacja genomu hantawirusów, genetyczne zróżnicowanie wraz z filogenezą molekularną, jak i opis choroby (HFRS) oraz patomechanizm rozwoju zakażeń hantawirusowych w organizmie gospodarza. Wstęp obejmuje także bogatą w treść epidemiologię choroby z opisem definicji przypadku, występowaniem zachorowań wśród ludzi na świecie w XX i XXI wieku, występowaniem rezerwuarów zwierzęcych, wektorów zakażeń hantawirusowych, ekologii zakażeń, grup narażenia (zawodowych, środowiskowych), ognisk zachorowań, endemii, epidemii, enzoocji i epizoocji wśród zwierząt. Ostatni podrozdział został zadedykowany metodom diagnostyki laboratoryjnej zakażeń hantawirusowych.

Przedstawiony przez Doktorantkę w części teoretycznej obszerny stan wiedzy na podstawie aktualnego piśmiennictwa może stanowić bezcenny materiał do publikacji artykułu przeglądowego.

W części praktycznej Doktorantka zawarła na ponad 86 stronach, 38 rycinach i 28 tabelach bardzo szczegółowy opis metod diagnostycznych (serologicznych, ankietowych i analiz statystycznych) wraz z wynikami. Badania przeprowadzone na przestrzeni 11 lat w latach 2007-2018 objęły grupę 1370 osób, z czego 721 przypadków ze wskazaniem klinicznym, 468 z narażenia zawodowego bezobjawowych, 181 z narażenia środowiskowego (leśnicy, zoolodzy), pobytowego (rezydenci DPS-ów, współdomownicy osób z rozpoznaną HFRS). W badaniach serologicznych wykorzystano test ELISA, a w przypadku reaktywnych surowic diagnostykę laboratoryjną uzupełniono testem potwierdzającym immunoblot i/lub immunofluorescencję pośrednią (IIFT). Doktorantka wykorzystwała w analizach serologicznych różnorodne testy komercyjne, a dodatkowo u osób z podejrzeniem HFRS przeprowadziła badania w kierunku obecności przeciwciał anti-*Leptospira* celem wykrycia ewentualnej koinfekcji. Dla przypadków HFRS potwierdzonych metodami laboratoryjnymi Pani mgr Anna Nowakowska opracowała ankiety obejmujące dane demograficzne, kliniczne i epidemiologiczne zawarte w dwóch załącznikach pracy. Ankietyzacja przeprowadzana była przez lekarzy na oddziałach szpitalnych dla przypadków identyfikowanych na bieżąco oraz przez pracowników Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Rzeszowie podczas prowadzenia czynności badających okoliczności wystąpienia zakażenia/zachorowania podlegającego rejestracji. Opracowane przez Doktorantkę ankiety charakteryzują się

wysokim stopniem uszczegółowienia stanu zdrowia pacjenta jak i czynników narażenia (ocena narażenia w pracy zawodowej, w środowisku życia i spędzania wolnego czasu).

W pracy zauważono drobne błędy natury językowej i merytorycznej (poniżej uszczegółowienie): str. 20 - „...koduje RNA zależna RNA polimerazę..” - ..koduje polimerazę RNA zależną od RNA; str. 22 - „, jako zmiany delecyjne dotyczą wypadnięcia pojedynczej lub większej liczby zasad a insercyjne dotyczą wstawienia pojedynczej lub większej liczby zasad” - jako zmiany delecyjne dotyczą utraty pojedynczych lub większej liczby nukleotydów, a insercyjne wstawienia pojedynczych lub większej liczby nukleotydów; str. 44, 51, 52, 55, 149 - sformułowanie „zarażać” zastąpić określeniem zakażać; str 55 - ”Wykrycie przeciwciał IgG w diagnostyce infekcji hantawirusowych jest patognomicznie potwierdzające zakażenie” - wykrycie przeciwciał IgG w diagnostyce infekcji hantawirusowych jest potwierdzeniem zakażenia; termin „patognomiczny” dotyczy objawów klinicznych; str. 62, 73 i 79 - „, rozcieńczenia próbek: 10 (20)  $\mu$ L badanej surowicy rozcieńczano w 1000  $\mu$ L (2 ml) buforu..” - surowicę rozcieńczano w proporcji (stosunku) 1:100 poprzez dodanie 10 (20)  $\mu$ L surowicy do 1000  $\mu$ L (2 ml) buforu; załącznik nr 5 przywoływany w treści pracy znajduje się pod numerem 4.

Dodatkowo umieszczam komentarz dotyczący interpretacji wyniku badania immunoblottingu przedstawionego na ryc. 9. Wynik testu immunoblottingu EUROLINE Anty-Hanta Profil 1 IgM/IgG firmy EUROIMMUN przedstawiony w postaci skanu „Identyfikacja swoistych przeciwciał anty-hantawirusowych w surowicy chorego u którego rozpoznano DOBV-HFRS” (Ryc. 9) przedstawia układ trzech silnych prążków widocznych na pasku w wyniku reakcji połączenia przeciwciał zarówno klasy IgM jak i IgG z antygenami Dobrawa, Puumala jak i Hantaan. Z perspektywy zastosowanych metod diagnostyki immunologicznej należałoby założyć/przyjąć pewien poziom nieswoistości reakcji przeciwciała - antygen wynikających z potencjalnych reakcji krzyżowych. Pewną formą uzupełnienia zastosowanych metod serologicznych byłoby uwzględnienie technik biologii molekularnej (np. reakcja PCR w czasie rzeczywistym) opartej na wykrywaniu materiału genetycznego ortohantawirusów i tym samym różnicowanie w zakresie serotypów szczególnie w przypadkach klinicznych u ludzi.

Rozdział dotyczący wyników Doktorantka opisała na 59 stronach w dwóch podrozdziałach:

I. Charakterystyka kliniczna wykrytej gorączki krwotocznej z zespołem nerkowym ludzi w Polsce w latach 2004-2018;

II. Charakterystyka występowania i narażenia na gorączkę krwotoczną z zespołem nerkowym ludzi w Polsce w latach 2004-2018.

Każdy z nich jest wyczerpująco opisany z uwzględnieniem danych zaprezentowanych w 26 tabelach oraz na 20 rycinach.

W badaniach wykonano 1370 oznaczeń serologicznych na obecność swoistych przeciwciał anty-hantawirusowych w klasie IgM i IgG od dwóch grup różniących się statusem klinicznym: od 721 osób manifestujących symptomy infekcji wirusowej z zespołem objawów sugerujących HFRS oraz od 649 osób bezobjawowych (badania retrospektywne). W obu grupach badanych przesłanką do analiz serologicznych było podejrzenie o zoonozie wynikające z przeprowadzonego wywiadu środowiskowego (np. kontakt z gryzoniami czy narażenie zawodowe). W efekcie badań u  $\frac{1}{4}$  wszystkich chorych potwierdzono etiologię hantawirusową gdzie 59% przypadków należało do serotypu PUUV, a 41% to przypadki DOBV-HFRS. W grupie bezobjawowej, wykryto z kolei 6,6% przypadków z potwierdzoną serokonwersją przeciwciał anty-hantawirusowych. Była to grupa specyficzna – obejmująca m.in. zoologów, którzy z uwagi na narażenie zawodowe, pracując w zwierzętarni, w której odnotowano laboratoryjne ognisko epidemiczne spowodowane serotypem PUUV przeniesionym z hodowanych nornic rudych, wykazali obecność przeciwciał Puumala ortohantawirusa w 46,3 % czy leśników województwa lubelskiego i podkarpackiego, u których wykryto podobny odsetek przypadków seropozytywnych jak u zoologów.

Doktorantka w sposób obszerny i precyzyjny dokonała charakterystyki objawów klinicznych HFRS uwzględniając różnice występujące w zależności od serotypu wirusa (tabela nr 4 jako podsumowanie danych z przekazanych 130 ankiet oraz tabele od 6-22). W badaniach wskazano również poziom istotności statystycznej występowania objawów klinicznych (tab. 5). Pani mgr Anna Nowakowska dokonała również cennej analizy zależności między czynnikami DOBV, PUUV, a występowaniem ciężkiego przebiegu HFRS w wyniku której wykazano 18-krotnie większą szansę na wystąpienie przebiegu ciężkiego zakażeń wywołanych serotypem DOBV niż w przypadku serotypu PUUV (tab. 26 i 27).

W dalszych badaniach dokonano charakterystyki wykrytej gorączki krwotocznej z zespołem nerkowym pod względem ekologii zakażeń i jej występowania u ludzi w Polsce

w latach 2004-2018 na podstawie badań ankietowych, wyników badań kohortowych oraz analiz dotyczących okoliczności narażenia ludzi na zakażenia hantawirusowe oraz na HFRS. Wyniki badań przedstawiono na 14 rycinach i w 3 tabelach. Na szczególną uwagę zasługuje fakt cykliczności zachorowań na HFRS. Doktorantka wychwyciła w swoich długoletnich badaniach (rok 2007-2022) wystąpienie wzrostu epidemicznego przypadków HFRS w roku 2014 i 2021. Dodatkowo wskazane zostały miesiące, w których zaobserwowano szczyt występowania zakażeń o etiologii PUUV (lipiec) DOBV (październik). Choroba częściej dotykała mężczyzn (69%), a przebieg kliniczny nie miał związku z płcią ani wiekiem. Wartością dodaną badania z punktu widzenia lokalizacji zakażeń jest informacja o rozmieszczeniu przypadków HFRS w gminach województwa podkarpackiego (ryc.31) z wyraźnym zróżnicowaniem na obszary przypisane PUUV-HFRS (powiat sanocki i leski) oraz DOBV-HFRS (powiat przemyski, przeworski, jarosławski, łańcucki, rzeszowski) przy czym najwyższą liczbę przypadków HFRS zanotowano w gminie Komańcza, pow. sanocki (33 zachorowania). Dodatkowo przeprowadzone zostały badania dot. okoliczności narażenia pobytowego/środowiskowego i zawodowego. W tym aspekcie Doktorantka również dostarcza cennych informacji o związku zamieszkiwania w bliskiej odległości od naturalnych siedlisk gryzoni i wykonywaniu prac sezonowych polowych, ogrodowych i w pobliżu domostw na zakażenia hantawirusowe.

W przedstawionych badaniach Doktorantka wyciągnęła siedem wniosków odzwierciedlających istotne osiągnięcia badawcze, rzucające nowe światło na bardzo ważny problem zakażeń hantawirusowych w Polsce. Badania dowiodły istnieniu poważnego, jakże niedocenionego przez lata zagrożenia epidemiologicznego ze strony ortohantawirusów, które co najmniej w postaci dwóch serotypów: Puumala i Dobrava-Belgrade występują w Polsce w postaci rodzimej (autochtonicznej). Na uwagę zasługuje wysoki odsetek zachorowań w Polsce ze szczególnym uwzględnieniem województwa podkarpackiego. Bardzo cenne dane z punktu widzenia epidemiologii uzyskane przez Panią mgr Annę Nowakowską świadczą o współwystępowaniu wspomnianych powyżej wirusów w kilku utrwalonych lokalizacjach w Polsce Południowej i Wschodniej. Ponadto zlokalizowano tereny o najwyższej zapadalności na HFRS (powiat sanocki i gmina Komańcza) co może mieć znaczenie w profilaktyce tych zakażeń na wymienionych terenach. Dodatkowym elementem korzystnym w zapobieganiu zakażeń było rozpowszechnienie ankietyzacji wśród klinicystów

co także wpłynęło na poszerzenie wiedzy o tej groźnej chorobie. W zakresie diagnostycznym opracowanie przez Doktorantkę autoryzowanego przez Państwową Inspekcję Sanitarną ankiet jak i opracowanie laboratoryjnego dwuetapowego modelu badawczego stanowi ważne narzędzie diagnostyczne, które może być wykorzystane w laboratoriach całego kraju.

Reasumując mogę stwierdzić, że rozprawa doktorska Pani mgr Anny Nowakowskiej została wykonana z wykorzystaniem nowoczesnych metod diagnostycznych i wnosi istotne elementy poznawcze dotyczące występowania zakażeń hantawirusami w Polsce. Praca ma również bardzo ważny aspekt praktyczny i wpisuje się w kanon prac epidemiologicznych o strategicznym znaczeniu dla zdrowia i bezpieczeństwa mieszkańców Polski ze szczególnym uwzględnieniem województwa podkarpackiego. Doktorantka wykazała się obszerną wiedzą teoretyczną w zakresie epidemiologii zakażeń ortohantawirusowych, a także mikrobiologii środowiskowej i posiada wszelkie umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Drobne uwagi zauważone w pracy w niczym nie umniejszają wartości dyzertacji.

W mojej ocenie, rozprawa doktorska **Pani mgr Anny Nowakowskiej pt. „Wykrycie gorączki krwotocznej z zespołem nerkowym ludzi w Polsce w latach 2004-2018 oraz badania nad jej występowaniem i charakterystyką”** odpowiada wymogom stawianym pracom doktorskim, określonym w art 187 Ustawy z dnia 1 maja 2023 roku, Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2023.742).

Niniejszym przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Kolegium Medycznego Uniwersytetu Rzeszowskiego pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej i jednocześnie wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr Anny Nowakowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK ZESPOŁU DS. BADAŃ NAUKOWYCH  
I KLINICZNYCH ORAZ WSPÓŁPRACY AKADEMICKIEJ  
1 Wojskowego Szpitala Klinicznego  
z Polikliniką SPZOZ w Lublinie  
*Agata Bielawska-Drozd*  
ppłk dr hab. n. med. i n. o zdr. Agata BIELAWSKA-DRÓZD