

Prof. dr hab. B. Brydak
Zatrudniona w Narodowym Instytucie Zdrowia Publicznego
Państwowy Zakład Higieny-Państwowy Instytut Badawczy
w Warszawie ul. Chocimska 24
zam.02-593 Warszawa ul. Stanisława Żaryna 5 m76
tel.691-352-979

Warszawa 21.07.2023r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Annie Nowakowskiej powołanej mnie jako recenzentki decyzją Rady Naukowej Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego z dnia 18.05 2023r., tytuł rozprawy doktorskiej ***Wykrycie gorączki krwotocznej z zespołem nerkowym ludzi w Polsce w latach 2004- 2018 oraz badania nad jej występowaniem i charakterystyką.***

Infekcja hantawirusowa to rozpowszechniona w świecie zoonza około 200 tysięcy zachorowań rocznie, wywołana przez co najmniej 22 gatunki Hantawirusów (wirusy RNA, rodzina Bunyaviiridae, rodzaj Hantavirus). U ludzi występuje w 2 różnych postaciach klinicznych;

- 1.Gorączka krwotoczna z zespołem nerkowym (HFRS) , jedynej wirusowej gorączki krwotocznej występującej w naszym Kraju.
2. Hantawirusowgo zespołu sercowo-płucnego (HCPS) występującego jedynie ma półkuli zachodniej.

Gorączka krwotoczna z zespołem nerkowym (*haemorrhagic fever with renal syndrome* HFRS) to zbiorcza nazwa, wprowadzona jeszcze 1983 roku przez Światową Organizację Zdrowia dla ostrej wirusowej zoonozy o wielobjawowej klinice i zróżnicowanej ciężkości, wywołanej przez kilka gatunków Hantawirusów, a przenoszonej przez wiele gatunków drobnych ssaków, głównie gryzoni i owadożernych. Ciężkość choroby zależy w głównej mierze od wywołującego ją genotypu wirusa, tworząc niejako układ dwubiegunowy: postaci najcięższe kliniczne (do 12-15%) śmiertelności wywołują genotypy **Hantaan (HAAV) i Dobrava (DOBV)**, postaci o najłżejszym przebiegu (tzw. nefropatia skandynawska, do 1% zgonów) wywoływane są przez genotyp Puumala (PUUV).

Polska była jedynym z ostatnich krajów Europy, w którym choroba ta obecna na całym kontynencie nie została wykryta. Po mimo wieloletnich poszukiwań przez polskich badaczy nie wykryto przypadków tej choroby u ludzi, ani obecności aktywnego zakażenia hantawirusami u ludzi. HFRS może być trudne, zwłaszcza w przypadkach subklinicznych, łagodnych i

atypowych. Niełatwe jest postawienie diagnozy w zachorowaniach sporadycznych. Do rutynowych identyfikacji przypadków zakażeń hantawirusowych u ludzi wykorzystuje się powszechnie metody serologiczne np. Elisa. Jednakże złotym standardem weryfikującym dla badań serologicznych i potwierdzającym czynnik etiologiczny jest odczyn neutralizacji. Oprócz wymienionych metod diagnostycznych które mają zastosowanie w identyfikacji hantawirusowych u ludzi należą metody genetyczne w tym wiele odmian techniki metod biologii molekularnej PCR, badania immunohistochemiczne czy immunochromatograficzne. HFRS występuje na terenie w Polsce endemicznie.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że wieloletnie bardzo żmudne, badania naukowe Zespołu pod kierunkiem Profesora Józefa P. Knapa w 2004 r. doprowadziły do wykrycia na Podkarpaciu, indeksowego, pierwszego przypadku w Polsce u człowieka stało się przyczyną podjęcia tej problematyki przez Doktorantkę.

Przekazana do recenzji rozprawa doktorska zawiera wykaz projektów badawczych realizowanych w pracy, spis treści, stosowane skróty, spis 31 tabel, 45 rycin w przewadze w kolorze, spis załączników, słowa kluczowe, streszczenie wersji polskie, abstrakt w języku angielskim, wstęp, cel pracy, materiały i metody badań wyniki, dyskusja, wnioski, piśmiennictwo oraz załączniki. Łącznie rozprawa doktorska stanowi 206 stronicowego opracowanie.

Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, bardzo szczegółowego rozbudowanego wstępu, wprowadzając Czytelnika w problematykę bardzo rzadkiego czynnika etiologicznego choroby jakie wywołuje infekcja spowodowana hantawirusem w Polsce, świadczący o bowiem o wiedzy doktorantki w przedstawionej problematyce recenzowanej rozprawy doktorskiej.

Celem rozprawy doktorskiej było odpowiedzenie na pytanie czy w Polsce występują rodzime przypadki zakażeń hantawirusowych u ludzi po stwierdzeniu w 2004 r przypadku indeksowego i wprowadzeniu badań nad wykryciem i charakterystyką etiologiczną, kliniczną i epidemiologiczną zakażeń ortohantawirusami ludzi w Polsce w przestrzeni lat 2004- 2018 wraz z przedstawieniem cech charakterystycznych przebiegu klinicznego poparte badaniami laboratoryjnymi DOBV-HFRS i PUUV-HFRS u osób hospitalizowanych w latach 2004-2018 i badaniami ankietowymi. Ocena wstępnej analizy sytuacji epidemiologicznej zakażeń ortohantawirusowych ludzi na terenie objętych badaniami wraz próbą ekstrapolacji na sytuacje endemiczna w Polsce.

Ogółem w latach 2007-2018 wykonano 1370 badań serologicznych, wykrywający swoiste przeciwciała anty-hantawirusowe w klasie IgM i IgG. Przebadano w tym 721 osób co stanowiło 52,6% wszystkich badanych, które miały objawy infekcji gorączkowej z zespołem objawów sugerujących możliwość HFRS i 649 osób co stanowiło 47,4% wszystkich badanych bez infekcji, te osoby były badane retrospektywnie. Należy podkreślić, że w obu grupach istotne było skierowanie od lekarza na badania o podejrzeniu zoonozy, ze względu na zgłaszany kontakt albo z gryzoniami lub ich odchodami.

Na podstawie badań serologicznych u 22,7% pacjentów potwierdzono etiologię zakażenia HFRS co stanowi 164 chorych na 721 wszystkich badanych. Szczegółowa analiza potwierdziła 71 przypadki DOBV-HFRS co stanowiło w 41% wszystkich przypadków laboratoryjnie potwierdzonych przypadków i 93 przypadki PUUV-HFRS co stanowi w 59% wyników pozytywnych.

W drugiej grupie badanych, zidentyfikowano 43 osoby na 649 ogółem badanych co stanowiło 6,6% u których potwierdzono utrzymującą się serokonwersję przeciwciał anty-hantawirusowych bez objawów infekcji aktywnej. Grupa ta nie była jednolita pod względem na narażenia na zakażenie, liczba odsetek osób seropozytywnych stanowiła 43 osób, ponieważ wśród badanych znaleźli się zoolodzy, którzy byli badani z powodu wystąpienia laboratoryjnego ogniska epidemicznego spowodowanego PUUV przeniesionym z hodowanych normic rudych. W zwierzętarni laboratoryjnej wśród 52 zdrowych zoologów stwierdzono aż u 21 osób przeciwciała IgG anty-hantawirusowe a u jednej osoby przeciwciała obu klas zarówno IgG i IgM. Laboratoryjne badania serologiczne u zoologów wykazały w 46,3% seropozytywnych osób przeciwciała były skierowane przeciwko Puumala ortohantawirusowi, którzy pracowali w woj. małopolskim i podlaskim. W analizowanej grupie osób zdrowych byli badani również leśnicy z dwóch województw- podkarpackiego i lubelskiego i których uzyskano podobne odsetki wyników wskazujących na zakażenie hantawirusowe przebiegające w przeszłości i tak przeciwciała anty-hantawirusowe tylko w klasie IgG stwierdzono u 2,4% leśników podkarpackich (ze swoistością przeciwciał anty-PUUV) i 3,18% leśników na lubelszczyźnie (ze swoistością przeciwciał anty-PUUV i anty-DOBV).

Kolejną grupę osób badanych byli m. in. rezydenci Domów Pomocy Społecznej zdrowi i współdomownicy mieszkający w woj. Podkarpackiem w różnych powiatach u których bieżąco rozpoznano HFRS- odsetek osób pozytywnych w tej grupie różnił się znacząco, bez objawów infekcji, zdrowych, ze względu na okoliczności narażenia w rodzinach osób HFRS+ wykazano obecność przeciwciał anty-hantawirusowych u 13,8% badanych a wśród rezydentów DPS tylko u 2,7% osób, u których serokonwersja była na podobnym poziomie, jak u leśników

podkarpackich (2,4% osób) ale ze swoistością przeciwciał anti- DOBV. Należy jeszcze zauważyć, że w grupie osób, które były diagnozowane z objawami chorobowymi 44 osoby skierowane były do badań diagnostycznych z podejrzeniem HFRS z innych województw tj. z lubelskiego, małopolskiego, śląskiego, opolskiego, dolnośląskiego i łódzkiego, u 13 z nich potwierdzono zachorowanie (29,5%), co stanowiło 1/3 wszystkich diagnozowanych osób, w tym u 11 stwierdzono w surowicach obecność swoistych przeciwciał obu klasach, tj. IgM i IgG a u 2 pozostałych tylko w IgG i tak wśród chorych z woj. lubelskiego rozpoznano DOBV-HFRS i PUUV-HFRS, z woj. małopolskiego PUUV-HFRS, z woj. śląskiego DOBV-HFRS i PUUV i PUUV-HFRS, z woj. śląskiego DOBV-HFRS i PUUV-HFRS, z woj. opolskiego DOBV-HFRS, z woj. dolnośląskiego DPV-HFRS i PUUV-HFRS, z woj. łódzkiego DOBV-HFRS. Porównując obie grupy chorych diagnozowanych w czasie kiedy mieli objawy, które można było ukierunkować na rozpoznanie HFRS w podkarpackiej grupie osób hospitalizowanych odsetek osób pozytywnych mieścił się na poziomie 22,5% chorych (150 osób na 665 badanych ogółem), podobnie było pomimo mniejszej grupy badanych w grupie *pozakarpackiej* tam HFRS potwierdzono u 29,5% hospitalizowanych. Zestawienie grup badawczych i liczby wykonanych badań serologicznych i etiologii zakażeń ortohantawirusowych przedstawiono w tab.3. W wyniku wykonywanych badań serologicznych u osób, które miały objawy choroby rozpoznano 164 przypadki HFRS wraz z zidentyfikowaniem etiologii tych zakażeń. Na podstawie analizy odpowiedzi immunologicznej na zakażenie hantawirusowe stwierdzono swoiste przeciwciała u 81 osób w obu klasach przeciwciał IgM i IgG anti-PUUV i u 60 osób przeciwciała w klasach IgM i IgG anti-DOBV, razem u 140 osób co potwierdziło u tych chorych aktywny status infekcji. U 24 osób, które miały objawy HFRS ale były badane po zachorowaniu, rozpoznanie HFRS opierało się na stwierdzeniu w surowicy tych pacjentów obecności swoistych przeciwciał w klasie IgG i taki status post-infekcyjny zidentyfikowano u 13 osób jako IgG anti-PUUV obecnie i u 11 osób IgG anti-DOBV. W 2 przypadkach PUUV-HFRS wykryto koinfekcją *Leptospira*, w tym w jednym przypadku metodą MAT (u aglutynacji mikroskopowej) zidentyfikowano przeciwciała w mianie 400 przeciwko kętkom *Leptospira interrogans* serowar Australis (w wynikach ELISA anti-*Leptospira* obecne były przeciwciała IgM) a w drugim przypadku stwierdzono przeciwciała przeciwko *Leptospira interrogans* w mianie 100/200, serowaru nie oznaczono (w wynikach ELISA anti-*Leptospira* obecne były przeciwciała IgM). Na podstawie Definicji przypadków chorób zakaźnych na potrzeby nadzoru epidemiologicznego, w badanym czasie tj. od 2007r. do 2018 r. stwierdzono na podstawie spełnienia kryteriów laboratoryjnych 140 przypadków potwierdzonej choroby hantawirusowej oraz 24 przypadki spełniające kryteria

przypadków prawdopodobnych, ogólnie 164 przypadki choroby hantawirusowej w Polsce a wg Międzynarodowej Statystycznej Klasyfikacji Chorób i Problemów Zdrowotnych choroby hantawirusowe sklasyfikowane są jako A 98.5 .

Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością wielu technik laboratoryjnych takich jak badanie immunoenzymatyczne ELISA, immunoblotingu, immunofluorescencji pośredniej, test immunoenzymatyczny Hantaan IgG/IgM Elisa oraz Puumala IgG/IgM, test immunoenzymatyczny IgG/IgM Elisa Hantavirus Pool 1 "Eurasia", test mikroaglutynacji itp.

Należy podkreślić do analizy wyników wprowadzono również dla przypadków, laboratoryjnie potwierdzonych zachorowań badania ankietowe zabierające dane do wywiadu epidemiologicznego w dochodzeniu epidemiologicznym. Były to wzory opracowanych oraz zastosowanie ankiet własnych, stanowiących uzupełnienie wywiadów lekarskich chorych obejmujące zbiory danych demograficznych, klinicznych i epidemiologicznych przedstawione w formie załączników.

W obrazie klinicznym, HFRS w Polsce jest chorobą gorączkową, z ostrą małopłytkowością i skazą krwotoczną, z ostrym uszkodzeniem nerek i powikłaniami wielonarządowymi. Przeprowadzone badania udowodniły, że etiologia DOBV podwyższała ciężkość przebiegu HFRS 18 krotnie. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że liczba identyfikacji HFRS wywołanego przez DOBV u Polskiej populacji jest wyższa niż rejestrowana w Europie Północnej i Zachodniej rejestrowana w Europie Północnej i Zachodniej. Obszarem endemicznym, z najwyższą zapadalnością na HFRS w Polsce rejestruje się w woj. podkarpackim. Analiza wyników badań epidemiologicznych i serologicznych przeprowadzonych przez Doktorantkę potwierdziła HFRS w 8 województwach Polski Wschodniej, Południowo- Wschodniej , Południowej i Centralnej. Należy podkreślić, że w Kraju HFRS jest chorobą skrajnie *niedoszacowaną* zwłaszcza u osób narażonych zarówno środowiskowo jak i zawodowa na kontakt z tak groźną zoonozą.

W pracy uwzględniono również analizę statystyczną przeprowadzonych badań typową dla tego typu analiz statystycznych.

Zgadzam się z Doktorantką z twierdzeniem, że docelowo należałoby wprowadzić nadzór epidemiologiczny typu *SENTINEL* , który polepszył by naszą wiedzę . Z obowiązku recenzentki proponuje i zachęcam , mając również świadomość trudności jakie czekają Doktorantkę proponowałabym wprowadzeniu *SENTINELU* zarówno epidemiologicznego jak również wirusologicznego obejmujący 16 Wojewódzkich Stacji Sanitarno-Epidemiologicznych . Mam pełną świadomość, jest to trudne zadanie, ale jestem przekonana , że zarówno Minister Główny Inspektor Sanitarny jak i Krajowa Konsultant ds. Epidemiologii

przyszedłby z pomocą a kwaterą główną byłaby WSSE w Rzeszowie, która ma dobrze wyszkolony personel.

Ma to kolosalne znaczenie , ponieważ monitoring sytuacji epidemiologicznej oraz enzootycznego rezerwuaru zwierzęcego hantawirusów na terenie Kraju ma również znaczenie, bowiem nie wszyscy zdają sobie sprawę wykorzystania tego czynnika biologicznego jako potencjalnej broni biologicznej-hantawirusy należą do uznanych czynników bioterroru.

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska spełnia warunki określone przepisami art.13 ustawy z dnia 14.03.2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule sztuki (tj. Dz. U. z 2017r) i tym samym zwracam się do Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytet Rzeszowski o dopuszczenie mgr Anny Nowakowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jako recenzentka pozwolę sobie postawić Członkom Rady Naukowej Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego wniosek o wyróżnienie rozprawy 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***, którą to pracę wysoko oceniam nie tylko pod względem merytorycznym ale również oryginalnych rozwiązań problemu naukowego, wykazanie ogólnej wiedzy teoretycznej Autora oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, a także podjęcie, bardzo ważnej problematyki w aspekcie zdrowia publicznego naszego Kraju Polski.



Prof. dr hab. Lidia B. Brydak
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego
Państwowy Zakład Higieny, Państwowy
Instytut Badawczy
Warszawa ul. Chocimska 24