

Prof. dr hab. Aleksander W. Demiaszkiewicz,
profesor zwyczajny
Zakład Epidemiologii i Patologii Inwazji Pasożytniczych
Instytut Parazytologii im. W. Stefańskiego PAN

Recenzja

rozprawy doktorskiej lek.wet. Ewy Bilskiej-Zajac pt. "Analiza struktury genetycznej nicieni z rodzaju *Trichinella* występujących w Polsce i jej zastosowanie w dochodzeniach epidemiologicznych"

Nicienie z rodzaju *Trichinella* są kosmopolitycznymi pasożytami występującymi u ponad 150 gatunków zwierząt, w tym ptaków, ssaków i gadów oraz u ludzi. Spośród opisanych dotąd dziewięciu gatunków i trzech genotypów *Trichinella*, w Polsce zarejestrowano występowanie czterech gatunków: *T. spiralis*, *T. britovi*, *T. nativa* i *T. pseudospiralis*. Trzy ostatnie gatunki występują głównie w populacjach zwierząt wolnożyjących. Parazytoza ta jest typową antropozoonozą, występująca zarówno w środowiskach leśnych jak i synantropijnych. Stwierdzana jest u zwierząt drapieżnych i gryzoni oraz zwierząt wszystkożernych, a ostatnio także u dzikich i domowych zwierząt roślinożernych. Przebieg włośnicy u ludzi charakteryzuje się gorączką, bólami mięśni i zespołem objawów alergicznych.

Jakkolwiek badania nad nicieniami z rodzaju *Trichinella* były prowadzone w kilku ośrodkach badawczych w kraju, były to najczęściej prace przyczynkowe, oparte na niedużym materiale, ograniczające się do rejestracji poszczególnych gatunków na określonym terenie. Dlatego też z uznaniem należy przyjąć podjęcie przez lek. wet. Ewę Bilską-Zajac badań nad analizą struktury genetycznej nicieni z rodzaju *Trichinella* występujących na terenie całego kraju i jej zastosowaniem w dochodzeniach epidemiologicznych. Są to pierwsze w Polsce tak kompleksowe badania nad tymi pasożytami. Wybór

tematu badawczego rozprawy należy uznać za bardzo trafny, mogący przyczynić się do dostarczenia istotnych danych, pozwalających na skuteczne przeprowadzenie dochodzenia epidemiologicznego w celu wykrycia źródeł zarażenia w ogniskach włośnicy. Wyniki tych badań są cennym uzupełnieniem dotychczasowej wiedzy dotyczącej epidemiologii tego pasożyta.

Recenzowana rozprawa została przygotowana bardzo starannie, posiada układ typowy dla rozpraw doktorskich, liczy ogółem 157 stron, zawiera 6 rozdziałów, streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych terminów i skrótów oraz obszerny spis literatury. Ryciny, rysunki i tabele umieszczone są we właściwych miejscach w tekście, co ułatwia czytanie rozprawy.

Pracę otwiera obszerny „Wstęp” liczący 21 stron, w którym Doktorantka opisała historię badań nad włośniami i włośnicą, systematykę rodzaju *Trichinella*, charakterystykę poszczególnych gatunków, morfologię pasożyta i jego cykl rozwojowy, a także występowanie włośnicy u zwierząt domowych, dzikich oraz u ludzi w Polsce i w Europie. Przedstawiła również przebieg i objawy kliniczne włośnicy u ludzi, oraz metody diagnostyki i leczenia. Omówiła także wynikające z rozporządzeń unijnych i polskich aktów prawnych postępowanie służb weterynaryjnych w przypadku wystąpienia włośnicy, podkreślając ważność badań genetycznych w dochodzeniu epidemiologicznym w ogniskach parazytozy.

W drugim, jednostronicowym rozdziale Autorka sformułowała cele pracy. Nadrzędnym celem badań było określenie możliwości zastosowania metod molekularnych w dochodzeniu epidemiologicznym w ogniskach włośnicy. Osiągnięcie tego celu zaplanowano w trzech etapach. Celem I etapu było rozpoznanie sytuacji epidemiologicznej włośnicy w Polsce u świń, dzików, szczurów i lisów oraz ustalenie geograficznego rozprzestrzenienia poszczególnych gatunków włośni. Celem II etapu było zbadanie zmienności genetycznej i określenie struktury genetycznej populacji *T. spiralis* i *T. britovi*.

Celem III etapu była próba zastosowania uzyskanych wyników w dochodzeniach epidemiologicznych.

W świetle przedstawionych we wstępie danych podjęcie tych badań było w pełni uzasadnione. Na uznanie zasługuje szeroki zakres planowanych badań i ich kompleksowy charakter.

Trzeci rozdział „Materiał i metody” obejmuje 15 stron. W rozdziale tym Autorka opisuje materiał badawczy w postaci próbek tkanki mięśniowej od 1500 dzików, 150 świń, 1740 lisów i 90 szczurów pochodzących ze wszystkich województw. Jest to niezwykle bogaty materiał badawczy, pozwalający na wykonanie szerokich badań. Autorka zamieszcza również wykaz odczynników użytych do izolacji larw metodą wytrawiania, odczynników do izolacji DNA z larw włośni, do amplifikacji DNA w reakcjach PCR oraz do elektroforezy. Wymienia także użytą aparaturę i wykorzystane programy komputerowe. Opisuje również szczegółowo pozyskanie izolatów larw włośni, izolację DNA z tych larw, a także użyte metody molekularne: multiplex PCR do identyfikacji gatunkowej larw *Trichinella* spp., PCR do amplifikacji fragmentu genu 5s rDNA, PCR do amplifikacji fragmentu genu mitochondrialnego COX1 oraz PCR do amplifikacji markerów mitochondrialnych. Opisuje także wykorzystane metody elektroforezy poziomej i kapilarnej, sekwencjonowanie i analizę sekwencji oraz przeprowadzone analizy statystyczne.

Dobór metod zastosowanych w ocenianej pracy jest właściwy i nie budzi zastrzeżeń.

Zasadniczą część rozprawy stanowi rozdział czwarty “Układ badań i wyniki” o objętości 61 stron, podzielony na 3 etapy. W etapie I Autorka zbadała występowanie włośni u dzików, świń, lisów i szczurów określając intensywność i ekstensywność inwazji oraz rozprzestrzenienie poszczególnych gatunków włośni na terenie kraju. Etap II obejmował charakterystykę molekularną wybranych subpopulacji włośni na podstawie fragmentów genów 5s rDNA i COX 1 oraz określenie zmienności genetycznej, zróżnicowania i struktury

genetycznej populacji *T. spiralis* i *T. britovi* na podstawie analizy markerów mikrosatelitarnego DNA. W etapie III została przeprowadzona analiza wyników dotyczących subpopulacji pochodzących od zwierząt z ogniska włośnicy w Mogilnie oraz od zwierząt pochodzących spoza tego ogniska, która pozwoliła na odróżnienie izolatów larw pochodzących z ogniska włośnicy od pozostałych subpopulacji *T. spiralis*.

W obszernym rozdziale piątym „Dyskusja” liczącym 32 stron Autorka w sposób dojrzały i zrównoważony porównała i przedyskutowała swoje wyniki z danymi pochodzącymi z publikacji innych badaczy.

W rozdziale szóstym “Wnioski” Doktorantka sformułowała najważniejsze stwierdzenia i wnioski logicznie wypływające z treści rozprawy, jeszcze raz podkreślające jej wartość. Rozprawę kończy obszerny aktualny i kompletny spis literatury przedmiotu obejmujący 205 publikacji. Wykorzystanie tak licznych pozycji piśmiennictwa dowodzi, że Doktorantka bardzo dobrze opanowała teoretyczne podstawy zagadnienia.

Do ważnych wyników rozprawy należy zbadanie rozprzestrzenienia włośni w populacjach dzików, trzody chlewnej i szczurów na terenie całego kraju, a także ekstensywności i intensywności inwazji, oraz stwierdzenie u świń bardzo niskiego odsetka zwierząt zarażonych włośniami, a w środowisku sylwacyjnym stosunkowo wysokiego. Istotnym było także ustalenie, że dominującym gatunkiem włośni u świń, szczurów i dzików jest *T. spiralis*, w populacji lisów *T. britovi*, a pozostałe gatunki: *T. pseudospiralis* i *T. nativa* występują sporadycznie. Interesujące jest również wykazanie, że *T. spiralis* w populacji dzików dominuje w zachodniej części kraju, a we wschodniej części stosunek *T. spiralis* i *T. britovi* jest bardziej wyrównany. Doniosłym osiągnięciem było zaobserwowanie w wyniku analizy uzyskanych sekwencji 5s rDNA oraz COX1 tylko 3 mutacji punktowych w populacji *T. spiralis*, a 41 polimorfizmów nukleotydów w populacji *T. britovi* oraz wykrycie larw będących hybrydami obu gatunków, a także potwierdzenie na podstawie analizy

mikrosatelitarnego DNA większej zmienności genetycznej w populacji larw *T. britovi* niż *T. spiralis*. Niezwykle cenne jest stwierdzenie, że badania struktury genetycznej subpopulacji włośni na podstawie analizy msDNA mogą być wykorzystane w dochodzeniach epidemiologicznych w ogniskach włośnicy. Wyniki te mają istotny aspekt praktyczny w epidemiologii i profilaktyce włośnicy u zwierząt i ludzi .

Rozprawę Doktorantka opracowała sumiennie i wnikliwie w oparciu o prawidłową metodykę badań a wytyczone cele pracy zostały osiągnięte w stopniu w pełni zadowalającym. Należy uznać za prawidłowe zarówno układ treści, wyciągnięcie wniosków w oparciu o przedstawioną dokumentację, a także wykorzystanie źródeł. Recenzowana dysertacja wykazując staranność wykonanych badań, samodzielność obserwacji i wnioskowania, a zatem pełne przygotowanie i dojrzałość jej Autorki do prowadzenia prac naukowych, pod każdym względem odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim.

Dlatego też stwierdzam, że przedłożona mi do oceny dysertacja spełnia wszystkie warunki określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Mam więc zaszczyt i przyjemność przedłożyć Wysokiej Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego wnioski o dopuszczenie lek. wet. Ewy Bilskiej-Zajac do dalszych, przewidzianych ustawą etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę nowatorstwo opiniowanych badań, ich szeroki zakres, doskonałe opracowanie rozprawy, wysoką wartość oraz aspekt praktyczny uzyskanych wyników, proponuję wyróżnienie tej rozprawy i przyznanie lek. wet. Ewie Bilskiej-Zajac stosownej nagrody.

Warszawa, 3.12.2018 r.

