

Prof. dr hab. Krzysztof S. Szkucik
profesor zwyczajny
Katedra Higieny Żywności Zwierzęcego Pochodzenia
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin, 21 listopada 2018 r.

Recenzja pracy doktorskiej

Pani lek. wet. Ewy Bilskiej – Zając pt. „Analiza struktury genetycznej nicieni z rodzaju *Trichinella* występujących w Polsce i jej zastosowanie w dochodzeniach epidemiologicznych”, wykonanej w Zakładzie Parazytologii i Chorób Inwazyjnych pod kierunkiem dr.hab. Tomasza Cencika prof.nadzw. (promotora) i dr. Mirosława Różyckiego (promotora pomocniczego)

Podstawą formalną wykonania recenzji jest Pismo Przewodniczącego Komisji Doktorskiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach Pana prof. dr. hab. Dariusza Bednarka z dnia 19.10.2018 r. (BRN-410/10/18), powołujące się na Uchwałę nr 115/2015 Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach z dnia 25.11.2015 r. powołującą recenzentów pracy doktorskiej lek. wet. Ewy Bilskiej – Zając.

Oczekiwania współczesnego konsumenta dotyczą żywności o korzystnych cechach sensorycznych i wysokiej wartości odżywczej, a przede wszystkim bezpiecznej, wolnej od różnego rodzaju zagrożeń fizycznych, chemicznych oraz biologicznych w tym także pasożytniczych. Pasożyty lub ich formy larwalne stanowią dla przemysłu mięsnego poważny problem powodowany przez straty ekonomiczne wynikające z dyskwalifikacji całych tusz lub ich części, a także jadalnych narządów wewnętrznych. Negatywna ocena sanitarno – weterynaryjnej mięsa i narządów wewnętrznych spowodowana może być negatywnymi zmianami jakościowymi tkanki mięśniowej i narządów wewnętrznych, a przede wszystkim obecność pasożytów lub ich metabolitów stwarza ogromne niebezpieczeństwo epidemiologiczne. W przypadku zagrożeń pasożytniczych największym problemem, z którym boryka się człowiek od starożytności po dzień dzisiejszy jest włośnica. W Polsce jak i w innych krajach Europy oraz na całym świecie, pomimo rygorystycznego postępowania dotyczącego badania poubojowego co roku stwierdzane są przypadki tej zoonozy.

Mając na względzie wymienione wyżej kryteria bezpieczeństwa, kryterium epidemiologiczne i epizootologiczne, tematyka pracy doktorskiej Pani lek. wet. Ewy Bilskiej – Zając dobrze wpisuje się w ten problem i oceniam ją jako bardzo potrzebną tak ze względów poznawczych, a także ze względu na jej charakter aplikacyjny, ukierunkowany na bezpośrednie zastosowanie w szeroko pojętym procesie rozpoznania sytuacji włośnicy w Polsce i postępowaniu epidemiologicznym.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została napisana zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami i posiada klasyczny układ przyjęty dla tego typu opracowań. Praca składa się z 7 rozdziałów liczących 157 strony tekstu, 38 tabel, 27 rycin i 207 pozycji piśmiennictwa. Pracę rozpoczyna wykaz terminów i skrótów użytych w tym opracowaniu oraz starannie zredagowane i odzwierciedlające całość badań streszczenia w języku polskim i angielskim.

W obszernym, obejmującym bowiem 21 stron, wstępie Doktorantka przedstawiła w sposób bardzo rzeczowy, a równocześnie wyczerpujący, obecny stan wiedzy na temat włośni i włośnicy. Przedstawiono historię badań, począwszy od roku 1835 kiedy wykryto pasożyta, poprzez badania Zenkera, który jako pierwszy, powiązał wystąpienie włośnicy u człowieka ze spożyciem zarażonej wieprzowiny, do czasów współczesnych, w których włośnica stanowi nadal poważny problem. W tym fragmencie wstępu, w mojej opinii, zabrakło historycznych aktów prawnych jak i opisu stosowanych wówczas technik badawczych. W kolejnych podrozdziałach przedstawiono systematykę, charakterystykę i cykl rozwojowy pasożyta, a następnie scharakteryzowano występowania włośnicy u zwierząt i człowieka. Charakteryzując występowanie włośnicy u ludzi koniecznym jest doprecyzowanie tytułu tabeli 1. Zgodnie z tematem pracy ostatnia część wstępu Doktorantka poświęciła postępowaniu służb weterynaryjnych w przypadku wykrycia włośnicy z uwzględnieniem badań serologicznych i genetycznych prowadzących do określenia gatunku pasożyta jako ważnego elementu z epidemiologicznego punktu widzenia.

Zawarty we wstępie przegląd piśmiennictwa oraz jego zestawienie stwarzają właściwe tło dla badań własnych i wskazują, że Autorka dobrze przestudiowała i przemyślała problem, w zakresie którego mieści się oceniana rozprawa. Na podkreślenie zasługuje fakt, że cytowane publikacje (łącznie 207 pozycji) obejmują zarówno najnowsze (krajowe i zagraniczne), jak i kilka nieco starszych, (pochodzących z końca ubiegłego wieku), ale ściśle związanych z tematem pracy i istotnych dla poruszanych zagadnień, zwłaszcza kiedy przedstawiono historię

badań nad włośniami i włośnicą. Zdecydowana większość to prace z ostatnich lat, które zostały opublikowane w języku angielskim. Z cytowanych pozycji literaturowych większość zostało opublikowanych w renomowanych czasopismach znajdujących się w wykazie JCR i posiadających niekiedy wysoki impact factor.

W drugim rozdziale podano główny cel podjętych badań jakim było określenie możliwości zastosowania badań molekularnych jako narzędzia wspomagającego dochodzenia epidemiologiczne w ogniskach włośnicy. Cel ten postanowiono osiągnąć poprzez:

- rozpoznanie sytuacji epidemiologicznej w Polsce z uwzględnieniem rozprzestrzenienia geograficznego gatunków włośni wykrywanych u świń, dzików, lisów i szczurów,
- rozpoznanie zmienności genetycznej i określenie struktury genetycznej *T.spiralis* i *T.britovi*,
- zastosowanie uzyskanych wyników w dochodzeniu epidemiologicznym.

Cele i założenia dysertacji zostały przedstawione w sposób jasny i nie budzący wątpliwości.

Układ doświadczeń jest logiczny i dobrze przemyślany. Przyjęte metody są odpowiednie do realizacji celów, które wytyczyła sobie Autorka. Zaplanowanie części eksperymentalnej pracy doktorskiej wymagało gruntownego przygotowania teoretycznego. O ile izolacja larw z tkanki mięśniowej oparta była na metodyce zgodnej z rozp Komisji (UE) 2015/1375 i jest standardowym postępowaniem w laboratorium badania włośni, tak dalsze etapy badań, a zwłaszcza badania genetyczne wymagały dużego doświadczenia, precyzji. oraz wiele czasu i wysiłku. Podkreślić należy bardzo dobry dobór materiału badawczego, na który składały się próbki tkanki mięśniowej świń i dzików dostarczanych do Krajowego Laboratorium Referencyjnego ds. Włośnicy przez Inspekcję Weterynaryjną oraz próbki mięśni lisów i szczurów, uwzględnienie których w postępowaniu epidemiologicznym uważam za trafne. Szczególną uwagę należy zwrócić na analizę danych. Dobór metod analiz statystycznych i pomocnych w ich programów komputerowych jest odpowiedni.

Wyniki badań, zgodnie z celami jakie postawiła sobie Autorka zostały przedstawione w trzech etapach. Otrzymane wyniki pierwszego etapu badań dotyczące występowania włośni w populacji świń, dzików lisów i szczurów zostały przedstawione w 8 tabelach i 4 rycinach, w których Doktorantka podała

przynależność gatunkową *Trichinella spp.*, występowanie tych gatunków w Polsce z podziałem na województwa oraz intensywność i ekstensywność inwazji u poszczególnych badanych gatunków zwierząt. W drugim etapie badań Autorka dokonała analizy struktury genetycznej i jej zmienności, wyizolowanych w I etapie badań dwóch gatunków włośni (*T. spiralis* i *T. britovi*). Do charakterystyki molekularnej tych populacji Doktorantka wybrała gen jądrowy 5s rDNA o wysokim stopniu konserwatywności i gen mitochondrialny COX1 charakteryzujący się większą zmiennością. Na podstawie tych analiz potwierdzono określoną przynależność gatunkową larw w przypadku 89 izolatów. Natomiast w trzech przypadkach wykazano, że były to hybrydy międzygatunkowe w pokoleniu co najmniej F2. Dalsze badania struktury genetycznej *T. spiralis* i *T. britovi* przeprowadzono na podstawie markerów mikrosatelitarnych. Na podstawie tych analiz wykazano jednolitą strukturę w większości subpopulacji *T. spiralis*, natomiast zdecydowanie większe zróżnicowanie genetyczne wykazano w subpopulacji *T. britovi*.

W trzecim, w moim przekonaniu, bardzo ważnym etapem badań były przeprowadzone analizy fragmentów genów 5s rDNA oraz COX1, a także mikrosatelitarnego DNA, które wykazały, że włośnie *T. spiralis* izolowane od zwierząt z badanego ogniska w Mogilnie różniły się od pozostałych subpopulacji tego pasożyta czym wykazano przydatność analiz genetycznych w dochodzeniu epidemiologicznym.

W rozdziale „Dyskusja” Doktorantka szczegółowo omawia wyniki poszczególnych etapów badań. Obszerna dyskusja wyników badań zawiera trafne stwierdzenia i komentarze. Sposób omówienia wyników badań w świetle zebranego i cytowanego piśmiennictwa dowodzi, że Autorka posiada szeroki zakres wiedzy co pozwoliło Jej na skonfrontowanie swoich osiągnięć z badaniami innych autorów. Przy omawianiu wyników Doktorantka wykazała się dużą erudycją i podobnie jak we wstępie rozprawy, dobrą znajomością piśmiennictwa związanego z omawianym tematem. Autorka wykazała się również umiejętnością krytycznej oceny wyników badań własnych, w świetle danych przedstawionych w najnowszych, doniesieniach literaturowych.

Na podstawie uzyskanych wyników badań Autorka wyciąga uzasadnione i logiczne wnioski – są one przemyślane i jasno przedstawione. Pięć końcowych wniosków wskazuje, że cel pracy został osiągnięty, a jej rezultaty, co sugeruje wniosek piąty mogą znaleźć praktyczne zastosowanie w analizowaniu ognisk

włośnicy i śledzeniu dróg transmisji pasożytów. W mojej opinii jedynie, druga część wniosku drugiego powinna ulec niewielkiej modyfikacji bowiem wyrównany stosunek obu gatunków (*T.spiralis* i *T.britovi*) dotyczy tylko województwa podlaskiego. Bezsprzecznie, we wszystkich województwach wschodnich odsetek stwierdzanych inwazji *T.britovi* jest większe w porównaniu do województw zachodnich.

Spełniając obowiązek recenzenta muszę wskazać także na nieliczne uchybienia redakcyjne. Pierwsza grupa uwag dotyczy piśmiennictwa i jego cytowania w tekście dysertacji:

- praca napisana jest w języku polskim i cytowania powinny być podane w tym języku np. Cabaj W. i wsp, 2004 lub Capo V.A. i Despommier D.D. 1996
- w wykazie piśmiennictwa tytuły prac powinny być podane w języku oryginału np. prace opublikowane w „Wiadomościach Parazytologicznych” czy „Medycyny Weterynaryjnej”
- obowiązujący skrót bibliograficzny „Medycyny Weterynaryjnej” to Med. Weter.

Ponadto w cytowaniu pozycji literaturowych wystąpiły pewne nieścisłości, które zaznaczyłem w maszynopisie .np:

Cabaj W i wsp. 2006 – prof. Cabaj jest jedynym autorem w tym opracowaniu
Bilska – Zając E i wsp 2016 - brak w wykazie piśmiennictwa

W tego typu opracowaniu jakim jest rozprawa doktorska nie powinno się używać sformułowań takich jak „patrochy i narogi” określenia pochodzące z gwary myśliwskiej – (str.113)

Autorka pobierała próbki o masie – nie wadze 50 g – str. 51

Przedstawione uwagi, zarówno redakcyjne jak i stylistyczne oraz sugestie nie rzutują na wartość merytoryczną ocenianej dysertacji i mogą być usunięte przed oddaniem pracy do druku.

Na wyróżnienie zasługuje fakt, iż część wyników tej dysertacji została opublikowana w takich czasopismach jak Parasitology Research, Journal of Veterinary Research, a także, co należy podkreślić w dostępnym dla wszystkich polskich lekarzy weterynarii „Życiu Weterynaryjnym”.

W ocenie ogólnej, recenzowaną dysertację oceniam jako interesującą i bardzo wartościową pozycję, która wnosi nowe istotne elementy poznawcze dotyczące włośnicy. Otworzyła ona nowe perspektywy wykorzystania badań genetycznych szczególnie analizy msDNA w analizowaniu ognisk włośnicy i śledzeniu dróg transmisji pasożytów. Oceniana rozprawa stanowi oryginalne, nowatorskie w skali kraju i nieliczne w świecie rozwiązanie, jakże ważnego z epidemiologicznego punktu widzenia problemu naukowego. Dysertacja wykazała również dużą wiedzę teoretyczną Doktorantki, a także Jej umiejętność prowadzenia samodzielnej pracy naukowej. Oceniana dysertacja w moim przekonaniu spełnia całkowicie wymogi stawiane pracom doktorskim w świetle art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z późniejszymi zmianami (jednolity tekst: Dz. U. z 27 września 2017 r. poz. 1789)

W związku z powyższym przedstawiam Wysokiej Komisji Doktorskiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej oraz dopuszczenie jej Autorki – Pani lek. wet. Ewy Bilskiej – Zająć do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uwzględniając znaczące dla nauki wartości poznawcze wpływające z ocenianego opracowania, a także możliwość zastosowania otrzymanych wyników w dochodzeniach epidemiologicznych uważam, że praca ta zasługuje na wyróżnienie przez Dyrektora Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach.


prof. dr hab. Krzysztof S. Szucik