

Olsztyn, dnia 8 września 2023 r.

Dr hab. Mirosław Mariusz Michalski

Katedra Parazytologii i Chorób Inwazyjnych
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
ul. Oczapowskiego 13, 10-719 Olsztyn

Ocena

osiągnięć naukowo-badawczych, przebiegu pracy zawodowej, dorobku dydaktycznego i popularyzatorskiego, współpracy międzynarodowej oraz osiągnięcia habilitacyjnego dr n. wet. Ewy Bilskiej-Zajac pt. „Epidemiologia molekularna *Trichinella spiralis* – rozpoznanie zmienności genetycznej populacji i śledzenie transmisji pasożyta w ogniskach włośnicy” opracowana na zlecenie prof. dr hab. Stanisława Winiarczyka – Dyrektora Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

W związku z pismem z dnia 20 lipca 2023 r. (BRN-4211/02/2023) podpisanym przez Dyrektora Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach Pana prof. dr hab. Stanisława Winiarczyka wydaję niniejszą recenzję. Podstawą jej opracowania była nadesłana dokumentacja przebiegu pracy zawodowej i naukowej dr n. wet. Ewy Bilskiej-Zajac oraz Jej rozprawa habilitacyjna, jako cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych (zgodnie z art. 219 ust. 1, pkt. 2b pod wspólnym tytułem: „Epidemiologia molekularna *Trichinella spiralis* – rozpoznanie zmienności genetycznej populacji i śledzenie transmisji pasożyta w ogniskach włośnicy” (Puławy, 2023). Autoreferat Pani dr n. wet. Ewy Bilskiej-Zajac obejmuje siedem rozdziałów, zawartych na 43 stronach oraz w dalszej części dokumentacji szereg ważnych dla oceniającego zestawień, oświadczeń, kopii certyfikatów, publikacji naukowych oraz wykazy dorobku naukowego. Całość, została przygotowana niezwykle starannie, zarówno pod względem merytorycznym jak i edytorskim. Dokumentacja postępowania habilitacyjnego Pani dr n. wet. Ewy Bilskiej-Zajac została opublikowana przez

Wydawnictwo Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego (PIWet-PIB) w Puławach, 2023 roku.

Wykształcenie i przebieg pracy zawodowej

Pani dr n. wet. Ewa Bilaska-Zajac ukończyła studia wyższe na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie w 2009 r., uzyskując dyplom i tytuł lekarza weterynarii. W tym samym roku podjęła pracę w Zakładzie Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach, a następnie w Zakładzie Parazytologii i Chorób Inwazyjnych, będąc zatrudniona kolejno na stanowiskach specjalisty inżynierjno-technicznego, asystenta i adiunkta. W 2019 roku uzyskała stopień naukowy doktora nauk weterynaryjnych na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „Analiza struktury genetycznej nicieni z rodzaju *Trichinella* występujących w Polsce i jej zastosowanie w dochodzeniach epidemiologicznych”. Promotorem wymienionej dysertacji był Pan prof. dr hab. Tomasz Cencek z PIWet-PIB w Puławach.

Obecnie, od 1.08.2019 roku jest zatrudniona na stanowisku adiunkta w Zakładzie Parazytologii i Chorób Inwazyjnych Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach.

Działalność naukowa i zawodowa

Habilitantka od początku swojej pracy naukowej bierze aktywny udział w działalności naukowej Zakładu Parazytologii i Chorób Inwazyjnych PIW-PIB. Tematem przewodnim badań naukowych Habilitantki jest włośnica. Tematykę tej części działalności naukowej można podzielić na kilka etapów badań: a. inne osiągnięcia w zakresie badań *Trichinella* spp., b. określenie występowania poszczególnych gatunków nicieni z rodzaju *Trichinella* w Polsce.

Dzięki wdrożeniu i zastosowaniu w macierzystym Zakładzie metod molekularnych do identyfikacji gatunkowej larw włośni, określono rozmieszczenie geograficzne poszczególnych gatunków włośni występujących w Polsce w populacji świń, dzików i lisów. Habilitantka wykazała, że najczęściej stwierdzanym gatunkiem u zwierząt (których mięso przeznaczone jest do konsumpcji) jest *T. spiralis*, a w następnej kolejności *T. britovi*. W trakcie badań zostały wykryte pierwsze przypadki inwazji *T. pseudospiralis* i *T. nativa* u dzików w Polsce. Wyniki te przyczyniły się m.in. do wycofania ze stosowania mało dokładnej metody trichinoskopowej do rutynowych badań dzików, a także do zmian zaleceń, co do możliwości mrożenia mięsa, jako

efektywnego środka inaktywującego larwy włośni. Wyniki wyżej opisanych prac zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych.

W 2013 r. Pani dr n. wet. Ewa Bilaska-Zajac skierowała swoje zainteresowania naukowe na próby poszukiwania markerów genetycznych, które mogłyby być skuteczne w rozróżnianiu larw włośni w obrębie gatunku *T. spiralis* oraz *T. britovi*. Do tego celu wybrała izolaty larw pochodzące od polskich dzików i lisów. Następnie na podstawie jądrowych sekwencji 5S rDNA-ISR i mitochondrialnych sekwencji genu CO1 określiła poziom polimorfizmu w obrębie obu badanych gatunków. Analiza sekwencji DNA uzyskanych z pojedynczych larw *T. britovi* wykazała 6 i 14 haplotypów odpowiednio w sekwencjach 5S rDNA-ISR i genu CO1. Tylko dwa haplotypy zarówno dla sekwencji 5S rDNA-ISR, jak i genu CO1 zostały wykryte u *T. spiralis*, co sugerowało wysoki stopień homogeniczności w obrębie tego gatunku. Prawdopodobnie, ten stan rzeczy można tłumaczyć stosunkowo niedawnym wprowadzeniem *T. spiralis* do Europy, szacowanym na 1000 lat przed naszą erą, w przeciwieństwie do ekspansji *T. britovi* na Europę, szacowanej na 15-20 mln lat. Badania przeprowadzone na ww. fragmentach genów 5S rDNA-ISR i mitochondrialnego genu CO1 wykazały jednak, że markery te nie dostarczają wystarczającej ilości danych do rozróżniania izolatów w obrębie gatunku *T. spiralis*, co stało się powodem poszukiwań innych, skuteczniejszych markerów.

Habilitantka wykryła larwy włośnia krętego, które okazały się być hybrydami pomiędzy *T. britovi* i *T. spiralis*. Larwy te zostały wyizolowane od czterech dzików i dwóch lisów. Wszystkie hybrydy były kombinacjami najbardziej rozpowszechnionych haplotypów, co sugeruje, że być może istnieje więcej hybrydowych kombinacji haplotypów. **Były to, pierwsze badania na świecie, w których wykryto naturalnie występujące hybrydy pomiędzy *T. spiralis* i *T. britovi*.** Co więcej, wykryte w hybrydach kombinacje haplotypowe wskazują, że poza krzyżowaniem się samic *T. spiralis* i samców *T. britovi* możliwe jest także krzyżowanie się samców *T. spiralis* i samic *T. britovi* (czego nie udało się uzyskać w badaniach eksperymentalnych). Potwierdza to możliwość naturalnego krzyżowania *T. spiralis* i *T. britovi* (bez znaczenia płci par) oraz wydawania płodnego potomstwa przez hybrydy. **Powyższe odkrycie istotnie wpływa na rozwój wiedzy na temat biologii *Trichinella* spp.** Powstawanie opisanych hybryd może doprowadzać do mieszania się poszczególnych cech oraz powstawania coraz silniejszych i odpornych osobników *Trichinella*.

Wyniki wspomnianych badań zostały opublikowane w dwóch artykułach naukowych.

Innym kierunkiem zainteresowań naukowych Habilitantki było określenie zróżnicowania genetycznego włośni *T. spiralis* i *T. britovi* w Polsce oraz wykrycie hybryd międzygatunkowych tych pasożytów na podstawie analizy markerów mikrosatelitarnego DNA. Oprócz wyżej wspomnianego wykrycia hybryd międzygatunkowych *T. spiralis* i *T. britovi* **za duże osiągnięcie w dziedzinie badań nad włośniami należy uznać** wyniki badań Habilitantki uzyskane w swojej pracy doktorskiej, dotyczącej „Analizy struktury genetycznej nicieni z rodzaju *Trichinella* występujących w Polsce i jej zastosowanie w dochodzeniach epidemiologicznych”. Wyniki badań opisane w pracy doktorskiej istotnie zwiększyły stan wiedzy w zakresie epidemiologii molekularnej *Trichinella* spp. i wykazały możliwość zastosowania markerów mikrosatelitarnych do rozróżniania izolatów larw w obrębie gatunku (*T. spiralis* lub *T. britovi*).

Pani dr n. wet. Ewa Bilska-Zajac **w dalszym rozwoju naukowym zainteresowała się także** innymi zagadnieniami związanymi z epidemiologią i diagnostyką zoonoz, w tym, wywoływanych przez nicienie z rodziny Anisakidae, przywry z rodzaju *Alaria*, pierwotniaki *Toxoplasma gondii*, tasiemce *Echinococcus* spp., nicienie: *Ascaris* spp., *Trichuris* spp. i *Toxocara* spp.

Habilitantka, w zakresie swojej pracy w Krajowym Laboratorium Referencyjnym nadzoruje i prowadzi badania **nad anisakiozą**. Badania występowania tych pasożytów w rybach morskich wynikają z regulacji prawnych. Jak wiemy, do zarażenia człowieka może dojść poprzez spożycie mięsa ryb zawierającego żywe larwy L3 pasożytów z rodziny Anisakidae. Szczególnie niebezpieczny jest gatunek *Anisakis simplex*, charakteryzujący się dużą ilością antygenów, które nawet po obróbce termicznej inaktywującej pasożyta, są niebezpieczne dla ludzi i wciąż mają potencjał alergizujący. Jest to bardzo ciekawy i niezwykle potrzebny kierunek badań, ponieważ zagrożenie anisakiozą w naszym kraju jest mało rozpoznane, a „moda” na spożywanie mięsa ryb w postaci surowej lub półsurowej jest coraz powszechniejsza. Niestety, w wielu przypadkach objawów chorobowych, lekarze diagnozują u ludzi alergię na mięso ryb, zamiast alergii na alergeny larw nicienia, przy praktycznie minimalnej wiedzy społeczeństwa w tym zakresie.

Ważną dziedziną badań Habilitantki są również badania nad przywrami z rodzaju *Alaria*. Badania dotyczyły aspektu występowania tego pasożyta u

żywcielei paratenicznych m.in. dzików oraz zaskrońców. W przypadkach wykrycia tego pasożyta przez lekarzy weterynarii podczas badania poubojowego mięsa pochodzącego od dzików w kierunku obecności larw włośni, brak jest przepisów regulujących postępowanie w takich przypadkach. **Przeprowadzone badania były jednymi z najbardziej kompleksowych w tym zakresie w Polsce i zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych.**

Na uwagę zasługują badania Habilitantki nad pierwotniakami *Toxoplasma gondii*, w aspekcie określenia rezerwuaru żywicielskiego oraz występowania *T. gondii* w mięsie i surowych produktach mięsnych. Przebieg tej zoonozy zazwyczaj jest bezobjawowy, jednak w niektórych przypadkach może stanowić poważne zagrożenie zdrowia i życia ludzi, a szczególnym ryzykiem obarczone są kobiety w ciąży i osoby o niskiej odporności. Człowiek zaraża się *T. gondii* najczęściej przez spożycie mięsa zawierającego cysty tych pierwotniaków lub poprzez spożycie warzyw zanieczyszczonych oocystami. Badania Habilitantki dotyczyły zarówno zwierząt gospodarskich (świnie, bydło, kozy) jak i wolnożyjących (dziki, lisy, szopy, piżmaki, kuny, borsuki, tchórze, norki, wydry, drobne gryzonie, ptaki) i wykazały znaczną prewalencję inwazji tego pierwotniaka u zwierząt rzeźnych (świń i bydła), jak również u wolnożyjących zwierząt mięso- i wszystkożernych (lisów, dzików i borsuków), a także u drobnych gryzoni i ptaków drapieżnych. Habilitantka brała udział w badaniach, których celem była zarówno detekcja pasożyta w mięsie i surowych produktach mięsnych sprzedawanych komercyjnie w Polsce, jak i jego charakterystyki molekularnej, w aspekcie zagrożenia zdrowia konsumentów. **Wyniki badań wykazały** dość znaczny stopień występowania postaci inwazyjnych pasożyta w produktach mięsnych, a przeprowadzone genotypowanie pozwoliło na określenie typu klonalnego izolowanych pasożytów, co pozwala istotnie uzupełniać wiedzę na temat epidemiologii toksoplazmozy w Polsce.

Badania nad *Echinococcus* spp. i innymi zoonotycznymi tasiemcami dotyczyły określenia występowania *Echinococcus* spp. i innych zoonotycznych tasiemców u lisów, jenotów, świń, kotów i psów w Polsce oraz analizy genetycznego różnicowania *E. multilocularis*. Habilitantka brała udział w badaniach nad bąblowicą wielojamową (alweokokożą), która jest jedną z najbardziej niebezpiecznych pasożytów dla ludzi. W przebiegu alweokokozy dochodzi do bardzo powolnego rozwoju form larwalnych pasożyta w wątrobie, przypominających do złudzenia zmiany nowotworowe typu złośliwego. W przypadku populacji świń, kotów oraz psów w Polsce, **były to pierwsze**

stwierdzone przypadki inwazji tego tasiemca opisane w kraju. Udział Habilitantki w badaniach nad zróżnicowaniem genetycznym *E. multilocularis* w Polsce, pozwolił wykazać, że na obszarze Polski dochodzi do swoistego mieszania się zasięgu występowania haplotypów *E. multilocularis* pochodzących z Europy Zachodniej z haplotypami mającymi swoje korzenie w Azji. Jednocześnie, Habilitantka uczestniczyła w badaniach nad optymalizacją metod molekularnych do identyfikacji tasiemca *Teania solium* oraz ocenie metod ekstrakcji DNA oraz metod PCR do wykrywania *E. multilocularis*. Wyniki wspomnianych badań zostały także opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych.

Habilitantka, wraz z gronem naukowców z zagranicznych jednostek naukowych brała udział w badaniach osadów ściekowych pod względem zagrożeń parazytologicznych, w tym, w opracowaniu metody do parazytologicznego badania odwodnionych osadów ściekowych i oceny rzeczywistego zanieczyszczenia tych substancji jajami pasożytów wskaźnikowych.

Zainteresowania naukowe Habilitantki nie zakończyły się na wspomnianych wyżej aspektach z dziedziny parazytologii i inwazjologii weterynaryjnej. W ostatnich latach działalności naukowej Pani dr n. wet. Ewa Bilska-Zajac brała udział w opracowywaniu i optymalizowaniu metod służących do wykrywania jaj pasożytów *Ascaris* spp., *Trichuris* spp. i *Toxocara* spp. w osadach ściekowych. Zasadniczą trudnością w tego typu badaniu parazytologicznym tych matryc jest obecność w nich flokulantów użytych do odwadniania ścieków, które uniemożliwiają wykrycie jaj pasożytów tradycyjnymi metodami flotacyjno-sedymentacyjnymi. Opracowana metoda okazała się wielokrotnie skuteczniejsza niż inne stosowane w tym celu w Polsce i na świecie. Metoda ta została opracowana w postaci Polskiej Normy i posłużyła do określenia stopnia kontaminacji jajami pasożytów osadów ściekowych z oczyszczalni ścieków w Polsce. Przeprowadzone badania wykazały, że osady ściekowe produkowane przez ponad 98% oczyszczalni ścieków komunalnych w naszym kraju zawierają jaja pasożytów, a liczba jaj w kilogramie suchej masy osadu w niektórych przypadkach sięga nawet 300 000. Wyniki wspomnianych badań zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych.

Udział w projektach badawczych

W okresie 10 lat pracy zawodowej, Habilitantka uczestniczyła w realizacji 18 zadań i projektów badawczych, z tego dwukrotnie jako kierownik projektu (drugi projekt w trakcie realizacji).

Uzyskane patenty

Habilitantka uzyskała dwa patenty o numerze prawa wyłącznego.

Recenzje wydawnicze

Habilitantka jest autorem 16 recenzji wydawniczych w renomowanych czasopismach naukowych, o zasięgu międzynarodowym.

Monografie i rozdziały w monografiach naukowych

Habilitantka była współautorem czterech monografii naukowych oraz współautorem jednego rozdziału w monografii naukowej.

Ocena innych aktywności naukowych, realizowanych w więcej niż jednej jednostce naukowo-badawczej i współpraca zagraniczna

Habilitantka w poszczególnych latach **stale podnosiła swoje kwalifikacje zawodowe** poprzez uczestnictwo w licznych szkoleniach oraz stażach zagranicznych. Największą aktywność naukowo-badawczą Habilitantki należy przypisać w momencie rozpoczęcia pracy w Zakładzie Parazytologii i Chorób Inwazyjnych w zespole ds. włośnicy dr. Mirosława Różyckiego pod kierownictwem prof. Tomasza Cencka. **Nabyte doświadczenia w stosowaniu metod molekularnych umożliwiły Habilitantce w latach 2012–2022, nawiązać współpracę z wieloma ośrodkami naukowymi, co zaowocowało współpracą trwającą do dzisiaj oraz uczestnictwem w kilkunastu stażach zagranicznych.** Należy w tym miejscu wymienić współpracę z Istituto Superiore di Sanita (ISS), European Union Reference Laboratory for Parasites, Rome, Italy i pracę pod kierunkiem jednego z najwybitniejszych parazytologów europejskich - Profesorem Edoardo Pozio. Dalej, współpracę z National Institute for Public Health and Environment (RIVM) w Bilthoven, The Netherlands. **Habilitantka w 2013 r. aplikowała z sukcesem o grant Short Term Mission z organizacji MED VET NET Association** (tytuł grantu: „Examination of genetic relationship between *Trichinella* isolates from Poland”). Od 2016 r. Habilitantka prowadzi współpracę z Prof. Anne Mayer-Scholl i jej zespołem z Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin, Germany. Bogata wiedza oraz nabyte doświadczenia w znanych europejskich pracowniach badawczych, **pozwołyły Habilitantce z sukcesem aplikować o grant Short term mission COST Euro FBP - „New technique MALDI-TOF MS used in investigations on protein profile of *Trichinella* isolates”,** który realizowała w w/w jednostce.

Podczas stażu w BfR, Habilitantka nabyła umiejętności badania nową techniką - MALDI-TOF-MS identyfikacji gatunkowej larw włośni. W tym czasie, Habilitantka miała możliwość współpracy z wieloma naukowcami z całego świata, m.in. poznała Prof. Andrea Armani oraz dr Lisę Guardone z Università di Pisa (UNIPi), Dipartimento di Scienze Veterinarie, Italy. Naukowcy ci opracowywali tematy bezpieczeństwa żywności w kontekście pasożytów odzwierzęcych. W 2019 r. Habilitantkę zaproszono do wzięcia udziału w konkursie o stypendium finansowane przez Uniwersytet w Pizie (pomysł badania głowonogów w kierunku zoonotycznych nicieni z rodziny Anisakidae). Zdobyte ww. stypendium pozwoliło Habilitantce odbyć miesięczny staż na Wydziale Weterynarii Università di Pisa (UNIPi), Italy. **Habilitantka prowadzi także długoletnią współpracę z dr Benjaminem Rosenthalem oraz dr Peterem Thompsonem z United States Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service, Animal Parasitic Diseases Laboratory, Beltsville, MD, USA.** Na jednej z konferencji organizowanej przez International Commission of Trichinellosis w 2015 r. Habilitantka przedstawiła wyniki badań własnych dotyczące stwierdzonego różnicowania genetycznego w obrębie populacji *T. spiralis* w Polsce. Przedstawiony wówczas pomysł stworzenia narzędzia pomocnego w dochodzeniach epidemiologicznych został przyjęty z wielkim zainteresowaniem i przyczynił się do zaproszenia Habilitantki do bezpośredniej współpracy w USDA - **stażu postdoktorskiego (w latach 2020-2021), pt. "Postdoctoral research opportunity in molecular epidemiology of parasites"**. Jedynie w wyniku tej współpracy naukowej zostały opublikowane trzy prace.

Aktywność naukowa Habilitantki dotyczy także aktywnej współpracy z ośrodkami krajowymi. Na terenie kraju, Habilitantka prowadziła współpracę z: Katedrą Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego. Polegała ona na określeniu występowania *Trichinella* spp. u lisów z różnych regionów Polski oraz Zakładem Biologicznych Szkodliwości Zdrowotnych i Parazytologii, Instytutu Medycyny Wsi w Lublinie. Zakres prowadzonych badań obejmował określenie zagrożenia dla środowiska lekarzy weterynarii ze strony takich patogenów jak *Toxoplasma gondii*, *Leptospira* spp., *Coxiella burnetii* i *Echinococcus granulosus*.

Ocena osiągnięć dydaktycznych

Na podkreślenie zasługuje również fakt, że Habilitantka wykazywała w poszczególnych latach aktywność szkoleniowo-dydaktyczną. Podczas pracy w PIWet-PIB, Habilitantka prowadziła zajęcia dydaktyczne dla lekarzy weterynarii

w ramach kursu „Badanie mięsa świń, dzików, koni i nutrii metodą wytrawiania próby zbiorczej z zastosowaniem metody magnetycznego mieszania”. W ramach tych zajęć, Habilitantka prowadziła zarówno wykłady jak i ćwiczenia laboratoryjne. W okresie ponad dziesięciu lat pracy zawodowej, Habilitantka przeprowadziła ponad 200 tego typu kursów, na których łącznie przeszkoliła ponad 3000 lekarzy weterynarii. Prowadziła także wykłady na: cyklicznych szkoleniach „Diagnostyka pasożytów z rodziny Anisakidae w rybach i produktach rybnych”, na specjalizacjach weterynaryjnych „Higiena Pasz”, „Higiena Zwierząt Rzeźnych i Mięsa” oraz „Choroby Świń”, a także na szkoleniach Inspektorów Weterynarii w ramach Programów Wieloletnich PIWet-PIB 2009-2015.

Habilitantka jest promotorem pomocniczym przewodu doktorskiego mgr inż. Anny Czubkowskiej, pt. „Ocena jakości mikrobiologicznej surowego mleka koziego i serów oraz charakterystyka wybranych bakterii chorobotwórczych występujących w tych produktach”.

Dodatkowo, Habilitantka bierze czynny udział w opiece nad praktykantami i stażystami odbywającymi obowiązkowe praktyki studenckie wynikające z regulaminu studiów. Jednocześnie, sprawowała opiekę nad młodymi pracownikami laboratorium Zakładu Parazytologii i Chorób Inwazyjnych.

Ocena osiągnięć organizacyjnych

Od początku swojej pracy naukowej, Pani dr n. wet. Ewa Bilaska-Zajac bierze czynny udział w pracach na rzecz Krajowego Laboratorium Referencyjnego (KLR) ds. włośnicy a także anisakiozy. Jest odpowiedzialna za organizację i koordynowanie spotkań z laboratoriami urzędowymi, a także badań biegłości dla terenowych laboratoriów badających mięso świń i dzików oraz laboratoriów badających ryby. Ponadto, w ramach pracy dla KLR ds. włośnicy oraz anisakiozy, co roku bierze udział w organizacji seminariów dla wojewódzkich koordynatorów badań biegłości, na których przedstawiane są wyniki badań oraz przekazywane są wiadomości dotyczące najnowszych danych naukowych oraz zmian w prawodawstwie w zakresie badań nad *Trichinella* spp. i Anisakidae.

Należy zaznaczyć, że Habilitantka w latach 2010-2017 była współorganizatorem siedmiu międzynarodowych konferencji naukowych: • Międzynarodowa Konferencja Naukowa: „Włośnice i włośnica - aktualne problemy”, Puławy 23-14.09.2010 • Międzynarodowa Konferencja Naukowa: „Aktualna sytuacja włośnicy w Europie Środkowej”, Puławy 07-08.11.2013 • Międzynarodowa Konferencja Naukowa: „Włośnica i inne zoonozy pasożytnicze związane z żywnością pochodzenia zwierzęcego”, Puławy 09-10.10.2014 •

Międzynarodowa Konferencja Naukowa: „Włośnica i inne pasożyty odzwierzęce związane ze środowiskiem sylwatyicznym”, Zaborek 05-08.10.2015

- Międzynarodowa konferencja Naukowa: Włośnica w nauce i praktyce, Bochnia, Polska, 08.09.2016
- Włośnica i inne odpokarmowe zoonozy pasożytnicze, Białowieża, 13-15.09.2017
- Międzynarodowa Konferencja Naukowa: „Zapobieganie włośnicy, anisakiozie i innym odpokarmowym pasożytom”, Rogowo, 11-13.09.2018.

Członkostwo w krajowych i międzynarodowych organizacjach i towarzystwach naukowych

Pani dr n. wet. Ewa Bilaska-Zajac jest członkiem: Lubelskiej Izby Lekarsko-Weterynaryjnej, International Commission of Trichinellosis, Polskiego Towarzystwa Parazytologicznego i Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych.

Działalność popularyzatorska – udział w sympozjach, konferencjach i kongresach naukowych

Pani dr n. wet. Ewa Bilaska-Zajac brała aktywny udział w znaczących konferencjach naukowych. W większości były to międzynarodowe konferencje naukowe, na których przedstawiała swoje badania zarówno w postaci ustnych prezentacji jak też w postaci plakatów. Wśród nich były to m.in. następujące konferencje naukowe: Międzynarodowa Konferencja Naukowa: Congress of International Association for Food Protection, Marsylia 15-17.05. 2013, SfAM-MVNA Summer Conference, Brighton, Wielka Brytania, 30.06-03.07.2014, 14th International Conference on Trichinellosis, Berlin, Germany 14-18.09.2015, 11 thWorkshop of National Reference Laboratories for Parasites, Rzym, Włochy, 23.05.2016, 12th European Multicolloquium of Parasitology in Turku, Turku, Finland, 20-24.07.2016, Conference of COST Action FA1408, EURO-FBP Working Group and Management Committee Meeting 2016 & EURO-FBP WG2 Meeting “Analytical methods for foodborne parasites in human and veterinary diagnostics and in food matrices” Lublijana, Słowenia, 20.09.2016, 12th Workshop of National Reference Laboratories for Parasites Istituto Superiore di Sanita, Rome, Italy. 18-19.05.2017, Conference of COST EURO-FBP “Outbreaks and outbreak investigations”, Istituto Superiore di Sanita Rome, Italy, 18-19.05.2017, Med-Vet-Net Association 5th International Scientific Conference 2017 One Health: Zoonoses - Emerging Threats, School of Veterinary Medicine, University of Surrey, Guildford, UK, 27- 29.06.2017, 14th International Congress of Parasitology ICOPA, Daegu, Korea 19-

24.08.2018, 15th International Conference on Trichinellosis, Cluj-Napoca, Romania, 26-31.08.2019, AAVP 65th Virtual Annual Meeting, USA 20-22.06.2020, Uniformed Services University of the Health Sciences, Department of Microbiology and Immunology, Virtual Seminar, USA 26.10.2020. **Łącznie 28 konferencji naukowych, kongresów i sympozjów.** W swoim dorobku naukowym Habilitantka posiada trzy wykłady na zaproszenie i 23 referaty wygłoszone na konferencjach, sympozjach i zjazdach naukowych. Habilitantka była także osmiokrotnie członkiem komitetów organizacyjnych i naukowych konferencji naukowych.

Ocena szczególnego osiągnięcia habilitacyjnego

dr n. wet. Ewy Bilskiej-Zajac

Na osiągnięcie naukowe składa się pięć publikacji wchodzących w skład jednotematycznego cyklu prac (cztery prace oryginalne i jedna praca przeglądowa) zatytułowanego „Epidemiologia molekularna *Trichinella spiralis* – rozpoznanie zmienności genetycznej populacji i śledzenie transmisji pasożyta w ogniskach włośnicy”.

WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD CYKLU

Załączony cykl publikacji obejmuje pięć prac z lat 2019-2021 indeksowanych w czasopismach międzynarodowych znajdujących się w bazie danych Journal Citation Reports (JCR). „Impact factor” (IF) został przypisany zgodnie z rokiem publikacji według „Journal Citation Reports”. Punktacja została przypisana zgodnie z rokiem publikacji, wg list czasopism punktowanych opublikowanych przez MEiN (wcześniej MNiSW). Wspomniane dane zostały potwierdzone analizą bibliometryczną przeprowadzoną przez Uniwersytet Warszawski, Bibliotekę Uniwersytecką w Warszawie.

- 1. Bilaska-Zajac E.,** Różycki M., Korpysa-Dzirba W., Belcik A., Ziętek-Barszcz A., Włodarczyk Ramus M., Gontarczyk A., Cencek T. *Trichinella* outbreaks on pig farms in Poland in 2012-2020. *Pathogens* 2021, 10, 1504, <https://doi.org/10.3390/pathogens10111504> IF 2021 = 4,531, MEiN = 100, liczba cytowań (WoS) = 4
- 2. Karadjian G., Bilaska-Zajac E.,** Bahn P., Py J-S, Johne A., Gassilloud B., Różycki M., Cencek T., Mayer-Scholl A., Vallée I. Species identification of *Trichinella* originated from various host and different geographical location by MALDI-TOF, *Experimental Parasitology*, Volume 213, 2020, 107890, ISSN 0014-4894, <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107890>. IF 2020 = 2,011, MEiN = 100, liczba cytowań (WoS) = 8

3. Thompson P., **Bilska-Zajac E.**, Zarlenga D., Liu M., Cencek T., Różycki M., Rosenthal B. Divergence at mitochondrial and ribosomal loci indicates the split between Asian and European populations of *Trichinella spiralis* occurred prior to swine domestication, *Infection, Genetics and Evolution*, Volume 88, 2021, 104705, ISSN 1567-1348, <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104705>. IF 2021 = 4,393, MEiN = 100, liczba cytowań (WoS) = 4
4. **Bilska-Zajac E.**, Rosenthal B., Thompson P. Trich-tracker – a practical tool to trace *Trichinella spiralis* transmission based on rapid, cost-effective sampling of genome-wide genetic variation. *International Journal for Parasitology*, 2022, Volume 52(2-3), 145-155, <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.08.002>. IF 2021 = 4.33, MEiN = 100, liczba cytowań (WoS) = 2
5. **Bilska-Zajac E.**, Thompson P., Rosenthal B., Różycki M., Cencek T. Molecular epidemiology of *Trichinella*: achievements and challenges, *Infection, Genetics and Evolution*, Volume 95, 2021, 105080, <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105080> IF 2021 = 4.393, MEiN = 100, liczba cytowań (WoS) = 0

Sumaryczny IF dla cyklu prac stanowiących osiągnięcie naukowe wynosi **19,658**. Suma punktów cyklu prac stanowiących osiągnięcie wg MEiN wynosi **500 punktów**. Liczba cytowań cyklu prac stanowiących osiągnięcie wg Web of Science wynosi **18**. Wkład pracy Habilitantki w powstanie wymienionego wyżej cyklu publikacji polegał głównie na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń, wykonaniu analiz dotyczących próbek pochodzących z Polski, opracowaniu i interpretacji wyników oraz sformułowania wniosków, napisaniu manuskryptu, a także opracowaniu własnej wizji przedstawienia tematyki badawczej. Przedstawione fakty świadczą o wiodącej roli Habilitantki w opracowaniu koncepcji badań naukowych i ich przeprowadzeniu. W pięciu publikacjach wchodzących w skład cyklu, Habilitantka jest pierwszym autorem w trzech z nich i drugim autorem w dwóch z nich.

Z analizy opublikowanych publikacji w przedstawionych do oceny cyklu jako szczególnego osiągnięcia naukowego, wynika jednoznacznie, że cel badań został jasno sprecyzowany, a metody badań zostały prawidłowo dobrane, zgodnie z najnowszymi zaleceniami i trendami badań w tej dziedzinie na poziomie światowym.

Krótką oceną znaczenia przeprowadzonych badań i osiągniętych wyników

Publikacja Nr 1: Bilaska-Zajac E.; Rózycki M.; Korpysa-Dzirba W.; Bełcik A.; Ziętek-Barszcz A.; Włodarczyk-Ramus M.; Gontarczyk A.; Cencek T. *Trichinella* outbreaks on pig farms in Poland in 2012–2020. *Pathogens* 2021, 10, 1504

Publikacja dotyczyła charakterystyki ognisk *Trichinella spiralis* w populacji trzody chlewnej w Polsce. Przeprowadzone badania wykazały, że co roku notuje się włośnicę u świń w co najmniej jednej lub nawet kilku fermach trzody chlewnej. Wyniki identyfikacji gatunkowej uzyskane za pomocą badania multiplex PCR wykazały, że w 26 fermach świnię zarażone były *T. spiralis*, natomiast w 4 stadach wykryto *T. britovi*. Łącznie 192 tusze świń zostały uznane za niezdatne do spożycia i przeznaczone do utylizacji ze względu na obecność włośni. Przeprowadzone badania wykazały, że problem włośnicy w populacji świń w Polsce jest niestety wciąż aktualny. Habilitantka dokonała analizy możliwych scenariuszy zarażenia świń w fermach. Najbardziej prawdopodobną przyczyną włośnicy w tego typu gospodarstwach, wydaje się zjedzenie przez świnię szczura zarażonego włośniami. Habilitantka zasugerowała, że opisane zarażenie było związane z nielegalną działalnością gospodarza np. poprzez dodanie do karmy odpadków po odstrzelonych dzikach lub lisach. Z powodu braku możliwości zdobycia niezbitych dowodów podczas wywiadu, przeprowadzenie badań laboratoryjnych z wykorzystaniem nowoczesnych technik badawczych, w tym spektrometrii mas i metod biologii molekularnej, może dać w takich przypadkach wiarygodną odpowiedź. Konieczność opracowania takich narzędzi badawczych było tematem kolejnych prac wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego.

Publikacja Nr 2: Karadjian G., Bilaska-Zajac E., Bahn P., Py J-S, Johne A., Gassilloud B., Rózycki M., Cencek T., Mayer-Scholl A., Vallée I. Species identification of *Trichinella* originated from various host and different geographical location by MALDI-TOF, *Experimental Parasitology*, Volume 213, 2020, 107890

Publikacja dotyczyła oceny przydatności techniki MALDI-TOF do szybkiej identyfikacji gatunków włośni. Habilitantka podjęła temat badań nowej metody opartej na spektrometrii mas celem przystosowania jej do identyfikacji gatunkowej włośni. Dane o występowaniu poszczególnych gatunków są podstawą do m.in. szacowania ryzyka szerzenia się inwazji w środowisku, jak też ryzyka dla zdrowia i życia ludzi. Różnicowanie

larw na poziomie gatunku i genotypu opiera się głównie na metodach molekularnych. W tym celu najczęściej stosuje się multipleks PCR, PCR-RFLP i sekwencjonowanie. Metody te są jednak bardzo czasochłonne, co uzasadnia konieczność poszukiwania ich szybszych odpowiedników. Habilitantka zauważyła, że w ostatnich latach spektrometria masowa z desorpcją laserową/jonizacją wspomaganą przez matrycę (MALDI-TOF MS) stała się rutynową metodą identyfikacji gatunków bakterii ze względu na jej skuteczność, porównywalną z metodami molekularnymi plus również szybkość jej wykonania i niski koszt badania. W/w metoda jest wykorzystywana do identyfikacji gatunków bakterii i grzybów, stąd badania te stały się inspiracją do opracowania metody opartej na MALDI-TOF MS także do identyfikacji gatunkowej *Trichinella* spp. Powstała baza danych, zawierająca widma spektrofotometryczne profilu białkowego izolatów larw włośni pochodzących z Niemiec licząca 33 rekordy okazała się zbyt skąpa, dlatego też w ramach akcji COST Euro-Fbp we współpracy z dr Karadijanem Habilitantka podjęła próbę przekształcenia prototypowej bazy widm spektrofotometrycznych *Trichinella* spp. w bazę o charakterze użytkowym do identyfikacji gatunkowej szczepów terenowych pochodzących od naturalnie zarażonych zwierząt. Utworzono widma główne (MSP), które zostały włączone do bazy prototypowej celem przekształcenia jej w bazę użytkową. W ten sposób baza prototypowa została wzbogacona o 102 widma spektrofotometryczne. Obecnie baza użytkowa zawiera dane z 70 izolatów *T. spiralis*, 51 izolatów *T. britovi*, 6 izolatów *T. nativa*, 5 izolatów *T. pseudospiralis*, po jednym izolacie T8, T9 i *T. patagoniensis*. Najwyższe oceny przypasowania do rekordów z bazy danych uzyskały widma spektrofotometryczne próbek *T. spiralis* ($\log > 2,0$), pozwalając na 100% identyfikację gatunkową badanych próbek. Podobnie stuprocentową identyfikację gatunku otrzymano dla szczepów *T. britovi*, *T. pseudospiralis* i *T. nativa*. Autorzy przeprowadzonych badań stwierdzili, że zastosowana metodyka spełnia wymagania dla identyfikacji gatunkowej larw *Trichinella* występujących w Europie (*T. spiralis*, *T. britovi*, *T. nativa* i *T. pseudospiralis*). Technika MALDI-TOF-MS okazała się metodą łatwą do przygotowania izolatów do badań, krótkim czasem analizy i prawdopodobnie dobrą alternatywą dla metod molekularnych.

Publikacja Nr 3: Thompson P., Bilaska-Zajac E., Zarlenga D., Liu M., Cencek T., Różycki M., Rosenthal B. Divergence at mitochondrial and

ribosomal loci indicates the split between Asian and European populations of *Trichinella spiralis* occurred prior to swine domestication, Infection, Genetics and Evolution, Volume 88, 2021, 104705

Kolejna publikacja dotyczyła opracowanie narzędzia umożliwiającego określanie podobieństwa genetycznego izolatów larw *T. spiralis* z wykorzystaniem sekwencjonowania NGS wybranych fragmentów genomu do praktycznego zastosowania w dochodzeniach epidemiologicznych. Istotą badań było zróżnicowanie genetyczne w obrębie gatunku *T. spiralis* poprzez analizę uzyskanych podczas sekwencjonowania genomowego całych sekwencji mitochondrialnych i dużych fragmentów rybosomalnego DNA. Badania dużych genomów (w tym przypadku ponad 64 mln bp) cechują się wysoką koszto- i czasochłonnością, z tego powodu, powyższy temat poruszany jest przez niewielką liczbę naukowców. Zmienność genetyczna w europejskiej populacji *T. spiralis* oszacowana wstępnie na podstawie analizy krótkich fragmentów rybosomalnego DNA, a także kilku markerów mikrosatelitarnych okazała się bardzo niska. W swoich badaniach Habilitantka wykorzystała metodę NGS, dokonała sekwencjonowania i rekonstrukcji genomu mitochondrialnego (mtDNA) oraz dużego fragmentu rybosomalnego (rDNA). Powstał w ten sposób mtDNA o długości 13 987 par zasad oraz rDNA o długości 7706 par zasad składający się z małej podjednostki rDNA 18S (18S), wewnętrznej sekwencji transkrybowanej 1 (ITS-1), podjednostki rDNA 5,8S (5,8S), wewnętrznej sekwencji transkrybowanej 2 (ITS-2) i sekwencji dużej podjednostki 28S rDNA (28S). Lokalizacje, z których pochodziły próbki o największej różnorodności allelicznej *T. spiralis* wskazały na pochodzenie tego gatunku z Azji, ponieważ posiadał on wyższy odsetek unikalnych haplotypów i znacznie większą rozbieżność między haplotypami niż próbki z zachodniej części Europy. Wniosek ten, okazał się również zgodny z hipotezami biogeograficznymi przedstawionymi w pracach innych autorów o środkowoazjatyckim pochodzeniu gatunków *Trichinella*, które następnie zostały rozproszone w różnych lokalizacjach geograficznych. Według analizy filogenetycznej haplotypy północnoamerykańskiego *T. spiralis* były zagnieżdżone wśród sekwencji europejskich i odróżniały się od tych w Europie jedynie 4 mutacjami, które zostały podzielone między sekwencje północnoamerykańskie. Nie było żadnej unikalnej mutacji, którą można by przypisać populacji

północnoamerykańskiej. Wyniki te, wraz z ogólnym brakiem zróżnicowania genetycznego wśród zachodniego *T. spiralis* wskazały, że do dokładnych badań epidemiologicznych i wyodrębnienia ognisk epidemii wywołanych przez europejskie i północnoamerykańskie *T. spiralis* potrzeba większej ilości danych genetycznych. Zarówno na podstawie mtDNA, jak i rDNA wykazano, że zachodnie *T. spiralis* rozgałęziają się od azjatyckiego *T. spiralis* już u podstawy całego kladu *T. spiralis*. Wyniki przeprowadzonych badań wskazały, że powstały kład zachodni jest parafiletyczny do izolatów azjatyckich i miał z nimi wspólnego wcześniejszego przodka. Oceniając zasadniczego celu pracy Habilitantki, jakim było opracowanie narzędzia, które będzie pomocne w dochodzeniach epidemiologicznych do identyfikacji różnic lub genetycznych powiązań analizowanych subpopulacji *T. spiralis* okazało się, że nawet tak zaawansowana i szeroka analiza opierająca się na całym genomie mtDNA i długich fragmentach rDNA jest niewystarczająca. Sekwencjonowanie całego genomu zapewniłoby najbardziej wszechstronne sposoby różnicowania izolatów *T. spiralis*. Jednak do scharakteryzowania każdego (~64 MB) genomu potrzebne byłyby olbrzymie zasoby finansowe, co podważałoby praktyczność takiego podejścia do śledzenia transmisji tego pasożyta. Alternatywą dla sekwencjonowania całych genomów są techniki ograniczonej reprezentacji genomu. Opierają się one na czerpaniu informacji z wielu loci rozproszonych w całym genomie, umożliwiając badanie genetyki populacji, selekcji, sprzężeń i powiązań fenotypowych.

Publikacja Nr 4: Bilaska-Zajac E., Rosenthal B., Thompson P. „Trich-tracker – a practical tool to trace *Trichinella spiralis* transmission based on rapid, cost-effective sampling of genome wide genetic variation”.

W przeprowadzonych badaniach, Pani dr n. wet. Ewa Bilaska-Zajac postanowiła opracować narzędzia, które efektywnie wykorzystają zmienność genetyczną rozproszoną w genomie tego pasożyta do rozpoznania różnic pomiędzy izolatami larw *T. spiralis*. Metodyka została oparta jest na technice RADseq, w trakcie której przy użyciu enzymów restrykcyjnych tworzy się biblioteki DNA. Takie biblioteki DNA zawierają sekwencje wielu losowych loci rozmieszczonych w analizowanym genomie. Jednoczesne sekwencjonowanie wszystkich takich fragmentów dostarcza informacji o tysiącach loci ale nie o całym genomie (co zmniejsza koszty badania). Uzyskane podczas

sekwencjonowania surowe dane genetyczne można badać pod kątem polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP), cennych dla zrozumienia epidemiologii, historii ewolucyjnej i ekologii. W pracy tej **Habilitantka opracowała narzędzie**, które nazwała Trich-tracker, do charakteryzowania zmienności i struktury genetycznej badanych izolatów larw na podstawie loci rozmieszczonych losowo w genomie *T. spiralis*. Narzędzie to łączy w sobie metodę biologii molekularnej - RADseq oraz analizy bioinformatyczne. Metoda RADseq opiera się na amplifikacji, a następnie sekwencjonowaniu NGS krótkich fragmentów genomu powstałych po cięciu dedykowanymi enzymami restrykcyjnymi. Uzyskane krótkie sekwencje nukleotydowe (około 120-150 par zasad) poddaje się kontrolom jakościowym oraz segregacji i przyrównuje do genomu organizmu właściwego (tutaj *T. spiralis*). Następnie Trich-tracker - integruje różne programy bioinformatyczne (Stacks, Bowtie 2, SAMtools, Geneious Prime i STRUCTURE) i tworzy katalogi loci dla badanej populacji. Na podstawie stworzonych katalogów porównuje się pomiędzy sobą pule loci uzyskane dla badanych próbek, co pozwala na odróżnianie analizowanych izolatów. Trich-tracker posiada wiele możliwości filtrowania danych, co ułatwia i przyspiesza analizę. W analizowanej pracy, opracowane narzędzie użyto do analizy 56 skolekcjonowanych izolatów *T. spiralis*, pochodzących z 4 różnych ognisk włośnicy oraz od dzików. Za pomocą Trich-trackera analizowano filogenetyczne podobieństwo izolatów a także ich strukturę genetyczną. Uzyskane wyniki wykazały, że każdy izolat w danym ognisku włośnicy nie różnił się znacząco od innych z tego ogniska (dotyczyło to 3 ferm); ognisko w czwartej fermie posiadało najbardziej niejednorodne genetycznie izolaty larw, przy czym izolaty te różniły się nie więcej niż 5 SNP-ami na milion par zasad. Taki stan rzeczy wskazuje na możliwość zarażenia się świń z dwóch różnych źródeł lub dwukrotnej inwazji *T. spiralis* w danym gospodarstwie. Izolaty larw włośni pozyskane od szczurów nie różniły się od izolatów od świń zarażonych w tym samym ognisku wskazując na to samo źródło ich zarażenia. Analizując różnice pomiędzy izolatami pochodzącymi od dzików z różnych regionów geograficznych zaobserwowano co najmniej 20 punktowych mutacji na milion zsekwencjonowanych zasad. Jeszcze większe różnice zanotowano porównując poszczególne izolaty z ognisk włośnicy świń do większości izolatów od dzików. Mutacje punktowe, SNP, generalnie powstają

stosunkowo wolno, co może sprawić, że metoda RADseq będzie mniej dokładnie informowała o ostatnio powstałych (najnowszych) rozbieżnościach populacji. Jednak wolniejsze tempo powstawania mutacji punktowych bardzo dobrze odzwierciedla i koreluje z utrwalonymi wzorcami genetycznymi przodków analizowanej populacji. Dlatego, nawet niewielka liczba różnych utrwalonych SNPów dostarcza wystarczających danych umożliwiających rozróżnienie odrębnych genetycznie izolatów. Habilitantka zwróciła uwagę na fakt, że liczba zsekwencjonowanych par zasad potrzebnych do rozróżnienia izolatów zależy od różnorodności genetycznej między izolatami. Istnieje bowiem korelacja, że im więcej zsekwencjonowanych par zasad, im więcej analizowanych loci, tym większa moc dyskryminacyjna opracowanej metody Trich-tracker. W przypadku dochodzeń epidemiologicznych istotną kwestią jest możliwość praktycznego zastosowania danego narzędzia, które powinno charakteryzować się szybkością i akceptowalną ceną. W opisanym doświadczeniu udało się ustalić powiązania epidemiologiczne między izolatami z Polski przy analizie zaledwie 400 000 par zasad (ponad 1000 losowych loci z całego genomu). Generalnie, zmienność genetyczną wystarczającą do rozróżniania izolatów *T. spiralis* uzyskano na podstawie analizy około 1% genomu jako całości. Ta ilość informacji jest zatem wystarczająca do szybkiego i efektywnego podziału izolatów na spójne grupy (ogniska włośnicy/fermy), wykrycia różnic pomiędzy izolatami, a co za tym idzie do wnioskowania o źródłach włośnicy w danym ognisku lub pokrewieństwie genetycznym badanych izolatów.

Publikacja Nr 5: Bilaska-Zajac E., Thompson P., Rosenthal B., Różycki M., Cencek T. Molecular epidemiology of *Trichinella*: achievements and challenges, Infection, Genetics and Evolution, Volume 95, 2021.

Piąta publikacja zamyka przedłożony cykl prac jako osiągnięcia naukowego w postępowaniu habilitacyjnym. Jest to praca przeglądowa i nietypowa dla opracowań habilitacyjnych, z tego względu, że zawiera dane niestanowiące wstępu, ale podsumowanie prowadzonych badań. Badania własne są tutaj przedstawione na tle światowych osiągnięć epidemiologii molekularnej. W badaniach organizmów eukariotycznych, wielokomórkowych, istnieją praktyczne ograniczenia takie jak względy finansowe, a także czasochłonność analiz, które istotnie spowalniają rozwój dziedziny. W przypadku nicieni *Trichinella* spp. epidemiologia

molekularna jest dziedziną ciągle rozwijającą się. Habilitantka dokonała systematycznego przeglądu literatury, podczas którego wyselekcjonowała ponad 300 prac, z których w publikacji wykorzystwała 83 prace, które znacząco przyczyniły się do zrozumienia biologii tego pasożyta i rozwoju dziedziny epidemiologii molekularnej. Sześć prac doświadczalnych (7%) jest autorstwa Habilitantki i istotnie wpływają one na przyszłe kształtowanie się tego kierunku badań. Pierwsze wymienione prace w niniejszej publikacji opisują osiągnięcia, które doprowadziły do klasyfikacji larw *Trichinella* i określenia systematyki tego rodzaju, czego dokonano na podstawie kryteriów biologicznych. Z kolei, kolejne prace doświadczalne, zawierające badania przeprowadzone z użyciem metod biologii molekularnej, istotnie przyspieszyły rozwój dziedziny pozwalając na określenie dokładnej systematyki włośni krętych, precyzyjne odtworzenie ewolucji tych pasożytów, z uwzględnieniem poszczególnych gatunków oraz szczegółowe rozpoznanie rozprzestrzenienia geograficznego gatunków tego pasożyta. Kolejne cytowane prace przedstawiają szereg badań przeprowadzonych na wielu różnych markerach genetycznych, które doprowadziły do wyjaśnienia historii ewolucji adaptacji fenotypowych, a mianowicie odporności na niską temperaturę dla *T. nativa*, T6 oraz *T. chanchalensis*. Istotny wkład w dziedzinę epidemiologii molekularnej przyniosły badania, dzięki którym udało się potwierdzić sugerowaną w doświadczeniach hybrydyzację międzygatunkową. Naturalne krzyżowanie się różnych gatunków włośni potwierdzono dla *T. nativa* i T6 a także dla dwóch najczęściej występujących w Polsce gatunków *T. spiralis* i *T. britovi*. Kolejne cytowane w niniejszej pracy doświadczenia, miały na celu określenie zróżnicowania genetycznego w obrębie populacji 18 różnych gatunków włośni. Pierwsze dowody zmienności genetycznej w obrębie gatunku *T. spiralis* odnotowano w 1992 r., poprzez wykrycie zmienności w allozymach izolatów z różnych regionów zoogeograficznych. Następnie wykazano pewne polimorfizmy w obrębie *T. spiralis* i w ten sposób zidentyfikowano wyraźne poziomy zmienności wśród gatunków. Podjęto również próbę określenia struktury genetycznej populacji włośni z izolatów zebranych z Europy, obu Ameryk, Afryki i Azji. Zastosowanie markerów mikrosatelitarnych pozwoliło wykazać, że izolaty *T. spiralis* były prawie jednolite genetycznie w całej Europie i w obu Amerykach (znacznie większą zmienność genetyczną zanotowano w 6 azjatyckich

izolatami *T. spiralis*). Opisane wyniki badań podkreśliły historię ewolucji i dotkliwość zjawiska ewolucyjnego w postaci wąskiego gardła jakie wystąpiło w populacji *T. spiralis* w Europie. Występująca jednorodność *T. spiralis* w Europie i obu Amerykach stwarza praktyczne trudności w rozróżnieniu nawet tych subpopulacji tego pasożyta, które dzieli duża odległość geograficzna. W kolejnych pracach zostały opisane badania przeprowadzone z użyciem innych markerów mikrosatelitarnych, prowadzone na izolatach również z całego świata, które potwierdziły olbrzymią homogeniczność genetyczną występującą w populacji *T. spiralis*, ale jednocześnie dostarczyły dowodów występowania różnych genotypów w populacji tego gatunku oraz na możliwość wielokrotnych zarażeń u dzików. Badania wykonane z użyciem powyższych markerów mikrosatelitarnych, wykonane przez Habilitantkę wykazały, że pomimo małego zróżnicowania genetycznego populacji *T. spiralis*, istnieją grupy - subpopulacje, które można od siebie odróżnić. Wyniki badań dają dużą nadzieję na stworzenie narzędzia przydatnego w praktycznym dochodzeniu epidemiologicznym, chociaż, czasochłonność, pracochłonność i wysokie koszty badań opartych na dostępnych markerach mikrosatelitarnego DNA mocno ograniczają możliwość zastosowania ich w analizie bieżących ognisk włośnicy. Jednak, dzięki zastosowaniu nowatorskiej w dziedzinie badań nad włośnicą metody ddRADseq, opartej na sekwencjonowaniu randomowych loci z całego genomu oraz ich analizie, udało się Habilitantce opracować narzędzie nazwane Trich-tracker, które dużo szybciej znajduje istotne różnice pomiędzy izolatami larw *T. spiralis*, niż jakakolwiek inna dotychczas stosowana technika. Technika ta jest zdecydowanie mniej czasochłonna i kosztowna, niż analizy markerów mikrosatelitarnych stosowane dotychczas w badaniach nad *T. spiralis*.

Ocena końcowa

Główne cele badań naukowych Habilitantki, których wyniki przedstawiono w ocenianym jednotematycznym cyklu publikacji, były następujące: 1. charakterystyka ognisk *Trichinella spiralis* w populacji trzody chlewnej w Polsce. 2. ocena przydatności techniki MALDI-TOF do szybkiej identyfikacji gatunków włośni. 3. opracowanie narzędzia umożliwiającego określanie podobieństwa genetycznego izolatów larw *T. spiralis* z wykorzystaniem sekwencjonowania NGS wybranych fragmentów genomu do praktycznego zastosowania w dochodzeniach epidemiologicznych.

Należy jednoznacznie stwierdzić, że Habilitantka zrealizowała wszystkie cele postawione sobie w pracy habilitacyjnej. Habilitantka dokonała charakterystyki 30 ognisk włośnicy u trzody chlewnej, które stwierdzono w Polsce na przestrzeni 10 lat, wykazując kilka możliwych scenariuszy zarażeń świń tymi pasożytami. Pani dr n. wet. Ewa Bilaska-Zajac dokonała oceny przydatności metody MALDI-TOF-MS do identyfikacji gatunkowej terenowych izolatów larw włośni. Przeprowadziła także analizę całego mitochondrialnego genomu oraz dużych fragmentów rybosomalnego DNA pozyskanych z 30 próbek *T. spiralis* w poszukiwaniu markerów przydatnych do rozróżniania subpopulacji w obrębie tego gatunku. Stwierdziła także brak istnienia wystarczającej liczby mutacji w obrębie analizowanych sekwencji, co spowodowało konieczność poszukiwania innych markerów i metod do osiągnięcia kluczowego celu. Etapem końcowym przeprowadzonych badań było opracowanie narzędzia o nazwie Trich-tracker, które pozwala na wykrywanie różnic genetycznych oraz pokrewieństwa pomiędzy analizowanymi izolatami *T. spiralis*.

Na podstawie wyników badań uzyskanych w pracach składających się na prezentowane osiągnięcie naukowe, Habilitantka sformułowała następujące wnioski:

1. włośnica nadal jest wykrywana w gospodarstwach trzody chlewnej i wciąż stanowi zagrożenie dla bezpieczeństwa konsumentów wieprzowiny.
2. metoda MALDI-TOF-MS jest przydatna do identyfikacji gatunku włośni występujących w Europie (*T. spiralis*, *T. britovi*, *T. nativa* i *T. pseudospiralis*).
3. liczba mutacji występująca w obrębie całego mitochondrialnego genomu oraz w dużych fragmentach rybosomalnego DNA jest niewystarczająca dla wykrywania różnic pomiędzy izolatami *T. spiralis* w kontekście epidemiologicznym.
4. opracowane narzędzie Trich-tracker umożliwia wykrywanie różnic oraz określanie pokrewieństwa genetycznego pomiędzy izolatami larw *T. spiralis*, dzięki czemu może mieć zastosowanie w dochodzeniach epidemiologicznych w ogniskach włośnicy.
5. źródłem włośnicy dla świń w gospodarstwach trzody chlewnej w Polsce mogą być zarówno wektory (np. szczury) ale także mięso, odpadki poubojowe i tusze zwierząt pozyskanych przez myśliwych dodawane nielegalnie przez właścicieli do paszy dla świń.

Wnioski końcowe

Jednotematyczny cykl publikacji składający się na osiągnięcie habilitacyjne oraz inne dokonania naukowo-badawcze Pani dr n. wet. Ewy Bilskiej-Zajac

uzyskane po nadaniu stopnia doktora są pracami oryginalnymi i stanowią poważny i niezwykle cenny wkład w rozwój nauk weterynaryjnych.

Czasopisma, w których opublikowano wyniki ocenianych badań mają wysoką i bardzo wysoką rangę na naukowym rynku edytorskim.

Jeśli zadamy sobie pytanie - jak ważne są tego typu badania na terenie kraju oraz w skali europejskiej i światowej, odpowiedź na tak postawione pytanie będzie jednoznaczna – przeprowadzone badania i opracowanie nowych metod diagnostycznych są niezwykle cenne w aspekcie epizootycznym i epidemiologicznym, zarówno dla lekarzy medycyny jak i lekarzy weterynarii oraz wniosły nową jakość w świecie nauki.

Tematyka publikacji Habilitantki wskazuje na Jej sprecyzowane zainteresowania badawcze. Są one ukierunkowane i związane z inwazjami *Trichinella spiralis*, ale jednocześnie, dotyczą one kilku innych ciągle groźnych pasożytów i inwazji pasożytniczych, jak *Anisakis simplex*, *Echinococcus multilocularis*, przywry z rodzaju *Alaria* czy *Toxoplasma gondii*. Dorobek naukowy Habilitantki oceniam wysoko zarówno jako wkład do postępu wiedzy w naukach weterynaryjnych, jak i w tworzeniu podstaw praktycznego działania - jako odpowiedzi na potrzeby praktyki związane z Jej miejscem pracy.

Dorobek naukowy Habilitantki oceniam wysoko, z pewnością przyczynia się on do postępu wiedzy w naukach weterynaryjnych, jak i w tworzeniu podstaw praktycznego działania. Dorobek ten jest odzwierciedleniem dociekliwości oraz potrzeby nieustannego poszerzania i pogłębiania nabytego doświadczenia Autora oraz wyrazem skutecznego dążenia do szerokiego wykorzystywania wiedzy w formacie aplikacyjnym. Warto w tym miejscu ponownie wskazać, że Habilitantka brała udział w szkoleniach zagranicznych oraz wykazywała dużą aktywność na forum wielu kongresów naukowych, a także aktywnie przekazywała swoją wiedzę i doświadczenie podczas szeregu szkoleń. Oceniany dorobek naukowy łączy w sobie cechy jednorodności w zakresie szeroko pojętej diagnostyki laboratoryjnej, opartej na najnowocześniejszych metodach badawczych, jest bardzo bogaty i przedstawia sobą bardzo duże walory naukowe, a także charakteryzuje go doskonała znajomość opracowywanych zagadnień.

Pani dr n. wet. Ewa Bilaska-Zajac, opublikowała ogółem 65 prac, w tym 21 prac doświadczalnych, 4 opracowania monograficzne, 17 prac przeglądowych i popularno-naukowych, opracowała 19 doniesień na zjazdy i konferencje naukowe i 4 materiały szkoleniowe. W 30 pracach Habilitantka była pierwszym autorem. Zwraca uwagę fakt, że większość publikacji przypada na okres po

uzyskaniu stopnia doktora nauk weterynaryjnych. Poziom i zakres doniesień naukowych oraz prac przeglądowych i popularno-naukowych, świadczą o Jej wielkiej aktywności w propagowaniu uzyskanych wyników badań i poszukiwaniu nowych dróg badawczych.

W świetle opisanych faktów stwierdzam, że Pani dr n. wet. Ewa Bilaska-Zajac – to wysokiej klasy specjalista w zakresie rozpoznawania i diagnozowania inwazji szeregu groźnych dla zdrowia ludzi i zwierząt pasożytów.

Kandydatka na doktora habilitowanego umiejętnie stosuje swoją wiedzę i warsztat naukowy w praktyce, co daje pełną podstawę do oceny, że posiada Ona odpowiednie przygotowanie do samodzielnej pracy badawczej. Jednym z efektów Jej wiedzy oraz doświadczenia zawodowego, jest wspomniane już wyżej opracowanie narzędzia badawczego, które nazwała Trich-tracker, do charakteryzowania zmienności i struktury genetycznej badanych izolatów larw na podstawie loci rozmieszczonych losowo w genomie *T. spiralis*. Narzędzie to łączy w sobie metodę biologii molekularnej - RADseq oraz analizy bioinformatyczne. Jest to niewątpliwie szczególne dokonanie naukowe, zasługujące na najwyższą ocenę.

Miłym akcentem w ocenie dorobku naukowego Pani dr n. wet. Ewy Bilskiej-Zajac jest podkreślenie Jej roli w kontynuowaniu niezwykle bogatego polskiego dorobku naukowego w zakresie badań nad *Trichinella spiralis* i włośnicą. Od roku 1950 polscy parazytologowie byli inicjatorami powstania kilku międzynarodowych Komisji, mających na celu promocję badań naukowych i zwalczanie groźnych inwazji pasożytniczych. M.in. w Polsce powstała Międzynarodowa Komisja Włośnicowa i przez 20 lat jej Sekretariat mieścił się w Polsce, początkowo we Wrocławiu, a następnie w Poznaniu. Polska była także gospodarzem kilku międzynarodowych konferencji naukowych poświęconych tym zagadnieniom, a polscy naukowcy przez kilka dekad zasiadali w najważniejszych europejskich i światowych gremiach zajmujących się włośniem krętym i włośnicą, ciesząc się wielkim autorytetem we wspomnianych zagadnieniach.

W świetle zaprezentowanych ocen i recenzji stwierdzam, że dotychczasowy dorobek naukowy, dydaktyczny i popularyzatorski oraz współpraca międzynarodowa Pani dr n. wet. Ewy Bilskiej-Zajac oraz nabyte przez Nią doświadczenia i umiejętności upoważniają mnie do postawienia wniosku o uznanie zarówno dorobku naukowego oraz przedłożonego jednotematycznego cyklu publikacji w formule osiągnięcia habilitacyjnego, jako odpowiadającym wymaganiom osiągnięcia naukowego i spełniających warunki

określone w obowiązującej Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. (art. 221, ust. 1) Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 r., poz. 742, Rozdział 3) i Ustawy z dnia 13 stycznia 2023 r. o zmianie ustawy – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce oraz niektórych innych ustaw (Dz.U. z 2023 r., poz. 212).

Wnoszę zatem wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach o dopuszczenie Pani dr n. wet. Ewy Bilskiej-Zajac do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego.



Olsztyn, dn. 8 września 2023 roku

Wniosek o nagrodę

Po zapoznaniu się z dorobkiem naukowym Pani dr n. wet. Ewy Bilskiej-Zajac poprzedzającym dysertację habilitacyjną oraz cyklem prac jako osiągnięcia habilitacyjnego pt. „Epidemiologia molekularna *Trichinella spiralis* – rozpoznanie zmienności genetycznej populacji i śledzenie transmisji pasożyta w ogniskach włośnicy”, wyrażam pogląd, że Habilitantka legitymuje się bardzo bogatym dorobkiem badawczym, szczególnie w ujęciu jakościowym. Jej opublikowane rozprawy naukowe wnoszą nowe, oryginalne wartości poznawcze, szczególnie w zakresie rozpoznawania, śledzenia transmisji i diagnostyki *Trichinella spiralis*. Wnoszę zatem wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach o przyznanie Pani dr n. wet. Ewy Bilskiej-Zajac stosownej nagrody, o ile pozwalają na to stosowne przepisy i regulaminy.



Olsztyn, dn. 8 września 2023 roku