

Olsztyn, dn. 19.07.2023 r.

prof. dr hab. inż. Dorota Fopp-Bayat
Katedra Ichtiologii i Akwakultury
Wydział Bioinżynierii Zwierząt
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Ul. Oczapowskiego 5; 10-719 Olsztyn

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr Natalii Adamkowskiej pt.: „Detekcja, wektory oraz elementy biologii Carp Edema Virus (CEV) w aspekcie hodowli karpia w Polsce”.

Ocena została sporządzona w związku z powołaniem mnie na recenzenta rozprawy doktorskiej mgr Natalii Adamkowskiej pt.: „Detekcja, wektory oraz elementy biologii Carp Edema Virus (CEV) w aspekcie hodowli karpia w Polsce”, zgodnie z Uchwałą Senatu Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie z dnia 15 maja 2023 r.

Badania z zastosowaniem analiz molekularnych w diagnostyce chorób wirusowych ryb są niezwykle istotne, ponieważ dostarczają ważnych informacji na temat infekcji, których identyfikowanie przy pomocy metod morfologicznych lub histopatologicznych jest niemożliwe. W rybactwie i akwakulturze, diagnostyka chorób wirusowych z wykorzystaniem technik molekularnych umożliwia nie tylko rozpoznanie patogenów u osobników zarażonych i nosicieli, ale również jest kluczowa w identyfikacji stad i populacji ryb wolnych od wirusów. Warto podkreślić, iż zastosowanie odpowiedniej techniki diagnostycznej umożliwia wnioskowanie na temat jednostki chorobowej lub nosicielstwa, co w rezultacie daje podstawę do wprowadzenia optymalnej terapii farmakologicznej lub podjęcia decyzji dotyczącej eliminacji zakażonych ryb.

DFB

Przeprowadzone przez Panią mgr Natalię Adamkowską badania naukowe obejmują identyfikację infekcji Carp Edema Virus (CEV) u karpia i innych gatunków ryb, a w szczególności charakterystykę zastosowanych metod molekularnych, które można wykorzystać w diagnostyce wyżej wymienionej infekcji wirusowej. Powyższa tematyka badawcza jest bardzo istotna w intensywnie rozwijającej się gospodarce rybackiej i akwakulturze, gdzie bardzo często duże zagęszczenia ryb oraz stres środowiskowy zwiększają prawdopodobieństwo wystąpienia infekcji wirusowej.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest opracowaniem, liczącym 57 stron, zawierających 42 ryciny i 16 tabel. Praca składa się z siedmiu rozdziałów, wśród których można wyróżnić: Wstęp, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusję, Wnioski, Literaturę oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Układ pracy jest poprawny, a proporcje pomiędzy poszczególnymi rozdziałami są właściwe i odpowiadają w pełni specyfice rozbudowanych metodycznie badań eksperymentalnych. Tytuł pracy w pełni odpowiada jej treści, a nakreślone cele i zadania uwarunkowały dobór materiału i konstrukcję części eksperymentalnej oraz wybór właściwych metod badawczych, co pozwoliło zrealizować zamierzone cele.

W rozdziale „1.1. Wstęp” autorka omawia biologię karpia, jego znaczenie gospodarcze w Polsce, wykorzystując, między innymi, dostępne dane statystyczne publikowane przez naukowców z Instytutu Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie PIB. W dalszej części Wstępu doktorantka omawia wpływ wybranych czynników środowiskowych na odporność i zdrowie ryb w warunkach akwakultury. Przedstawia różnorodność drobnoustrojów związanych z karpami, pochodzącymi z różnych środowisk zarówno naturalnych, jak i sztucznych.

Autorka syntetycznie opisuje choroby wirusowe karpia, skupiając się głównie na wiosennej wiremii karpia (SVC), Koi herpesvirus (KHV), ospie karpi, martwicy układu krwiotwórczego karasi, Carp edema virus (CEVD)/ śpiączce karpi koi (KSD). Opis wymienionych chorób wirusowych karpia obejmuje między innymi charakterystykę zakażenia, objawy kliniczne, charakterystykę warunków środowiskowych, będących skutkiem ryzyka wystąpienia jednostki chorobowej oraz czynniki stresogenne zwiększające ryzyko zakażenia. Autorka omawia również organizmy stanowiące wektory wybranych jednostek chorobowych. W tej części pracy zabrakło mi szczegółowego opisu wirusa CEV oraz wprowadzenia do diagnostyki tego patogenu, wraz z opisem stosowanych metod.

Główny cel niniejszej pracy doktorskiej dotyczył określenia stopnia zainfekowania wirusem CEV karpi oraz wybranych gatunków ryb pochodzących ze zlewni Odry i wybranych gospodarstw

rybackich. Doktorantka zdefiniowała również cele szczegółowe, które umożliwiły precyzyjną realizację zaplanowanych prac badawczych. Cele szczegółowe:

1. Zdefiniowanie gatunków wektorowych wśród ichtiofauny umożliwiających transmisję poziomą wirusa w środowisku.
2. Określenie tropizmu CEV poprzez zastosowanie hybrydyzacji *in situ*.
3. Analiza pozyskanych sekwencji fragmentu genomu CEV w kontekście ewoluowania nowego izolatu w wodach Polski.
4. Wskazanie potencjalnych ścieżek transmisji CEV w środowisku wodnym.

W rozdziale „3. Materiał i Metody”, w podrozdziale „3.1. Materiał do badań”, doktorantka przedstawia informacje dotyczące gatunków badanych ryb (14 gatunków ryb), liczebności prób (469 prób) i lokalizacji poborów prób do badań (siedem lokalizacji) oraz charakteryzuje ryby, które stanowiły przedmiot jej badań. Liczebność badanych prób świadczy o pracowitości przeprowadzonych badań.

Podrozdział „3.2. Metodologia analiz molekularnych” zawiera opis stosowanych metod analitycznych, obejmujących: izolację DNA, amplifikację czyli zastosowanie łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) zarówno, standardowej jak również w czasie rzeczywistym tzw. Real-Time PCR. W podrozdziale „3.2.2.3. Sekwencjonowanie i analiza sekwencji”, doktorantka zamieściła informację dot. sekwencjonowania metodą Sangera przeprowadzonego przez firmę Genomed oraz przez laboratorium Rządowe Instytutu Chorób Wirusowych w Riems (Niemcy) przy zastosowaniu kitu QIAquick Gel Extraction kit DNA Gel (QIAGEN, Niemcy). Kolejny podrozdział, „3.2.2.4. Hybrydyzacja *in situ*” jest bardzo dobrze opisany i wskazuje na zaawansowane umiejętności laboratoryjne doktorantki. Ostatni podrozdział części metodycznej, „3.3. Opracowanie bioinformatyczne wyników” jest opisany skrótowo i uwzględnienia najważniejsze informacje dotyczące analizy bioinformatycznej wyników sekwencjonowania przy zastosowaniu oprogramowania Geneious Prime 8.0 i programu BLAST-n (dostępnego w bazie NCBI) oraz analizy wyników hybrydyzacji *in situ* z wykorzystaniem arkusza kalkulacyjnego Excel.

W części związanej z analizą sekwencjonowania zabrakło szczegółowego opisu tej analizy z uwzględnieniem przygotowania prób oraz informacji o aparaturze analitycznej wykorzystanej do przeprowadzenia badań. Brakuje również informacji o liczebności badanych prób (czy badano wszystkie próby, czy wybierano reprezentatywne?).

W opinii recenzenta, ta część metodyki powinna zawierać opis wszystkich elementów analizy, umożliwiając odtworzenie badań na podstawie opisanej metody. Zauważyłam również, niefortunne włączenie podrozdziałów „3.2.2.3. Sekwencjonowanie i analizy sekwencji” oraz „3.2.2.4. Hybrydyzacja *in situ*” do podrozdziału 3.2.2. Amplifikacja.

W opisie analizy reakcji PCR oraz real-time PCR brakuje szczegółowej informacji dot. liczebności analizowanych prób. O ile na podstawie analizy wyników nested-PCR można zidentyfikować liczebność tych prób to w przypadku real-time PCR jest to skomplikowane, a wręcz niemożliwe. Opisując skład mieszaniny reakcji PCR jak również skład mieszaniny do real-time PCR doktorantka podaje jedynie objętości poszczególnych odczynników – poprawniej byłoby opisać stężenia końcowe stosowanych odczynników. Dodatkowo, objętości odczynników wchodzących w skład miksu reakcyjnego zamiast w mikrolitrach podane są w mililitrach, co prawdopodobnie jest błędem edytorskim.

W podrozdziale „3.2.2.4. Hybrydyzacja *in-situ*” autorka w tabeli 9 zawarła powtórzenia tych samych prób; czy to był zamierzony efekt? W dalszej części pracy autorka informuje, że utrwalanie tkanek przeprowadzono cyt. „maszynowo automatycznie” bez precyzyjnego opisu tej metody oraz zastosowanej aparatury. W metodyce zastosowano następujący opis cyt. „... próbki następnie przepłukiwano w 99,8% alkoholu” – autorka w tym przypadku nie podała rodzaju alkoholu. W tej samej części pracy doktorskiej znajduje się następujący opis, cyt.: „Hybrydyzację *in situ* prowadzono w oparciu o dodane w ilości 5ul homogenaty z tkanek miękkich izolowane z karpia koi i karpia hodowlanego”. W przypadku „karpia hodowlanego” autorka powinna wskazać nazwę linii karpia lub opisać go jako karpia o dzikim ubarwieniu (ponieważ karp koi jest również karpem hodowlanym). W tym fragmencie zabrakło precyzyjnego opisu stosowanych homogenatów - czy zastosowane homogenaty były przygotowywane w ramach badań niniejszej pracy doktorskiej, czy były to gotowe dodatki stanowiące zasoby laboratorium ? W tej części metodyki brakuje również opisu dotyczącego obserwacji mikroskopowych preparatów oraz opisu techniki identyfikacji stopnia zainfekowania na podstawie „skali detekcji” (skala barwna), po hybrydyzacji *in situ*. Chociaż fragment dot. opisu zestawu mikroskopowego został uwzględniony w kolejnym podrozdziale „3.3. Analiza bioinformatyczna” to jest on mało precyzyjnie opisany, bowiem brakuje tu informacji dot. na przykład rodzajów obiektywów i powiększeń stosowanych w trakcie prowadzonych analiz, jak również informacji dot. oprogramowania wykorzystanego w tej części analizy.

Poza wyżej przedstawionymi drobnymi zastrzeżeniami, redakcja metod badawczych nie budzi uwag i świadczy o dobrej znajomości najnowszego warsztatu analitycznego, umożliwiającego prowadzenie badań molekularnych.

Rozdział wyniki stanowi najobszerniejszą część pracy i zawiera 17 stron, na których zamieszczono opis uzyskanych wyników, z uwzględnieniem rycin i tabel. Rozdział ten został podzielony na dwa podrozdziały, w których opisano występowanie i tropizm wirusa CEV oraz molekularną analizę wybranej sekwencji DNA tego wirusa. W podrozdziale „4.11. Nested PCR” autorka zaznaczyła, że uzyskała pozytywne wyniki analiz dla 38 osobników spośród 413 badanych ryb, które poddała sekwencjonowaniu. W podrozdziale „4.1.2. Real-time PCR”, Pani mgr Natalia Adamkowska pisze, cyt.: „Poniżej wartości 37 uznano negatywny wynik próbki ze względu na ilość poniżej progu detekcji metody. Uzyskano osiem pozytywnych wyników (tab. 14)”. Powyższy fragment pracy doktorskiej jest trudny do zinterpretowania, ponieważ brakuje informacji o liczbie prób uwzględnionych w tej części analiz. Bardzo proszę o doprecyzowanie tej części badań. W podrozdziale „4.1.3. Hybrydyzacja *in situ*”, na szczególną uwagę zasługuje bardzo czytelna dokumentacja fotograficzna uzyskanych wyników analiz, umożliwiającą precyzyjne wnioskowanie. Opisana przez Panią mgr Natalię Adamkowską w kolejnym rozdziale (4.2.) analiza filogenetyczna z wykorzystaniem uzyskanych sekwencji DNA charakterystycznych dla Carp Edema Virus wykazała występowanie dwóch kładów, świadczących o zmienności tego patogenu. W tej części pracy doktorskiej zabrakło opisu dotyczącego omówienia analiz sekwencji aminokwasów przedstawionych na Rycinach 22A i 22B. Chociaż w przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej można znaleźć pewne niedociągnięcia, warto podkreślić, iż opis wyników badań jest odzwierciedleniem trudnej i żmudnej pracy laboratoryjnej oraz ukazuje dobrą znajomość wielu zaawansowanych i skomplikowanych technik laboratoryjnych. Warto również dodać, iż zaprezentowany przez Panią Natalię Adamkowską bardzo ambitny warsztat badawczy wymagał zarówno pracy terenowej, związanej z poborem prób do badań, jak również precyzyjnej pracy laboratoryjnej, z wykorzystaniem zaawansowanych metod molekularnych, które były realizowane zarówno w jednostce macierzystej jak również w laboratorium Rządowym Instytutu Chorób Wirusowych w Riems w Niemczech.

Na pięciu stronach rozprawy doktorskiej Pani mgr Natalia Adamkowska przeprowadziła Dyskusję wyników, wykorzystując najnowszą, odpowiednio dobraną literaturę. Na szczególne podkreślenie zasługuje przedstawienie informacji bieżących, dotyczących rozprzestrzeniania się infekcji CEV na świecie, na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat oraz opis stosowanych metod w diagnostyce tej infekcji. Kolejne, ważne informacje dotyczą potencjalnych wektorów umożliwiających transmisję CEV w środowisku naturalnym oraz w akwakulturze.

W tej części rozprawy doktorskiej również zauważyłam kilka błędów edytorskich, które wymagają poprawy. Poniżej przedstawiam fragmenty, które sugeruję poprawić:

- Na stronie 48 (w drugim akapicie), we fragmencie zdania cyt.: „...w okolicach nasady blaszek skrzelowych oraz blaszek skrzelowych.” warto zrezygnować z powtórzenia („blaszek skrzelowych”) lub doprecyzować drugi obszar blaszek skrzelowych.
- Na str. 49 w pierwszej linii powinna być wstawiona kropka kończąca zdanie.
- W kolejnym zdaniu (druga linia str. 49) pominięto współautorów dot. cytacji „...Adamek (2016)...”. W tym zdaniu powinno być odniesienie do Adamka i współautorów (2016).
- Na stronie 29 opis do Ryciny 4 powinien znajdować się pod ryciną.

Na podstawie uzyskanych wyników analiz doktorantka zauważyła, że diagnostyka wirusowa pod kątem CEV powinna być poszerzona o zastosowanie analizy hybrydyzacji *in-situ*. Tę propozycję uważam za bardzo ważną i wartościową, jednocześnie zastanawiam się czy praca była wykonywana pod kątem przygotowania wytycznych dot. diagnostyki infekcji CEV?

Zwieńczeniem uzyskanych wyników badań, zrealizowanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej, jest pięć wniosków, które wskazują jak ważne są te badania.

Rozdział Literatura zawiera 82 pozycje literaturowe oraz trzy źródła internetowe. Drobne błędy, wymagające korekty, dostrzegłam w cytowaniu piśmiennictwa; zauważyłam również pozycje literaturowe, które nie zostały zacytowane. Poniżej przedstawiam wspomniane uchybienia:

- str. 13 – jest Lirski, 2008; brak w spisie literatury; ponadto w spisie literatury jest Lirski i Myszkowski 2008;
- str. 16 – jest Bekesi, 1985; w spisie literatury jest Bekesi i Csontos 1985;
- str. 16 – jest Bauer i Faktorowicz (1969); brak w spisie literatury;
- str. 16 – jest Antychowicz 2014; w spisie literatury - Antychowicz 2014 występuje w dwóch pozycjach, które należałoby rozróżnić w cytacjach;
- str. 16 – jest Maj-Paluch i in., 2019; brak w spisie literatury;
- str. 18 – jest Radosavljević 2017; w spisie literatury jest Radosavljević i in. 2017;
- str. 47 – jest Murakami i in., 1976; brak w spisie literatury.

Ponadto w tekście brakuje cytacji następujących pozycji literaturowych, zamieszczonych w spisie literatury: Perleberg i in. 2003, Pramoda i in. 2020, Soliman i in. 2019, Tyburski i in. 2008, Vanslyke i in. 1991.

Przytoczone powyżej uwagi i sugestie mają charakter dyskusyjny, a głównie korektorski i w niczym nie umniejszają wysokiej wartości naukowej niniejszej rozprawy doktorskiej.

Podsumowując uważam, że przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr Natalii Adamkowskiej stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego oraz posiada właściwą konstrukcję, przyjętą w tego rodzaju opracowaniach. Rozprawa doktorska napisana jest starannie, a zastosowane liczne metody badawcze świadczą o bardzo dobrym opanowaniu nowoczesnych analiz molekularnych. Uzyskane wyniki wnoszą wiele nowych informacji o charakterze poznawczym i praktycznym, które mogą być wykorzystane w diagnostyce infekcji CEV. Biorąc pod uwagę wartość merytoryczną pracy, jej oryginalność oraz walory poznawcze i użyteczne oświadczam, iż praca pt.: **„Detekcja, wektory oraz elementy biologii Carp Edema Virus (CEV) w aspekcie hodowli karpia w Polsce”** w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim, zgodnie z aktualnie obowiązującą Ustawą o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym (art. 3 z dnia 14.03.2003 r.; Dz. Ustaw nr 65, pozycja 595). W związku z tym przedkładam Radzie Naukowej Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie wnioski o dopuszczenie mgr Natalii Adamkowskiej do kolejnych etapów przewodu doktorskiego.

