

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Autor - Nguyen Thuc Tuan

Tytuł : Detekcja herpesvirusa anguillae (AngHV-1) na terenie północno-zachodniej Polski z uwzględnieniem zaleceń dla gospodarowania zasobami węgorza europejskiego (*Anguilla anguilla*)

Opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej wyniki stanowią treść niżej wymienionych, opublikowanych, oryginalnych prac naukowych;

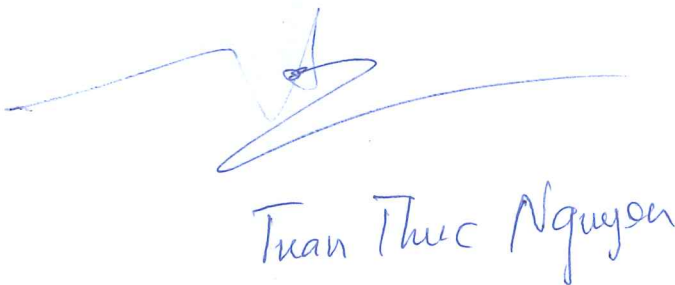
1. Nguyen T.T., Kempter J., Panicz R., 2016. Monitoring of herpesvirus anguillae (AngHV-1) infections on European eel in north-west Poland. *Veterinary Medicine*, 72 (9), 564-566.
2. Nguyen T.T., Kempter J., Panicz R., 2016. Presence of herpesvirus anguillae (AngHV-1) DNA in the native ichthyofauna of north-western Poland. *EJPAU 2016 Volume1 Issue 4*.
3. Nguyen T. T., Yeonhwa J., Kiełpińska J., Bergmann S.M., Lenk M., Panicz R. 2017. Detection of herpesvirus anguillae (AngHV-1) in European eel *Anguilla anguilla* originating from northern Poland – assessment of sustainability of selected diagnostic methods. *Journal of Fish Diseases* DOI: 10.1111/jfd.12689

Celem pracy doktorskiej była analiza skali zagrożenia węgorza europejskiego *Anguilla anguilla* związanego z występowaniem choroby wirusowej spowodowanej patogenem AngHV-1. Za cele szczegółowe wynikające z realizacji zadania głównego przyjęto: detekcję herpesvirus anguilla (AngHV-1) na terenie północno-zachodniej Polski celem oszacowania skali zagrożenia (1), zdefiniowanie wektorów wirusa wśród rodzimej ichtiofauny, stanowiących potencjalnie drogi rozprzestrzeniania się AngHV-1 w środowisku wodnym (2), oszacowanie skuteczności wybranych metod diagnostycznych i przydatności wybranych tkanek, celem określenia skutecznej diagnostyki AngHV-1 podczas realizacji programów zarybieniowych węgorzem (3), skonstruowanie wytycznych dla podmiotów związanych z podchowem węgorza oraz dla ośrodków zarybieniowych (4).

W pracy doktorskiej wykorzystano metody biologii molekularnej takie jak PCR, namnażanie wirusa na hodowlach komórkowych, izolacja wirusa AngHV-1 z wykorzystaniem różnych metod diagnostycznych, sekwencjonowanie i analiza bioinformatyczna. W ramach wykonanych badań, wyciągnięto następujące wnioski; rekomenduje się wycofanie metodyki

izolacji wirusowego DNA z wykorzystaniem DNA-zolu i zastąpienie jej wyłącznie metodą kolumnową podczas izolacji AngHV-1 z tkanek węgorza europejskiego (1), zaleca się wykorzystanie do diagnostyki AngHV-1 tylko fragmentów skrzel i skóry z wykluczeniem stosowania metody miksowania prób, często stosowanej w diagnostyce komercyjnej (2), obecność AngHV-1 u węgorzy pozyskanych bezpośrednio od importera z Danii stanowiących materiał wyjściowy do podchowu jest zainfekowany w 66%, co skłania do wprowadzenia w Polsce obligatoryjnej diagnostyki w kierunku tego wirusa (3), karaś srebrzysty, okoń, sandacz, sterlet i babka bycza to wektory mogące potencjalnie brać udział w transmisji horyzontalnej AngHV-1 (4), w badaniach mających na celu określenie obecności wirusa AngHV-1 u węgorzy należy bezwzględnie stosować metodę nested PCR ze względu na wysoki stopień pozyskiwania wyników fałszywie negatywnych w konwencjonalnym PCR (5), poziom zainfekowania materiału zarybieniowego można uznać za alarmujący, dlatego chcąc prowadzić rozsądny i racjonalny program restytucji powinno się bezwzględnie badać każdą partię materiału obsadowego pod kątem nosicielstwa w kierunku AngHV-1 i innych, potencjalnie groźnych wirusów dla węgorzy (6).

Podsumowując, ważnym elementem gospodarowania węgorzem jest przede wszystkim wprowadzenie stałego monitoringu zdrowotności materiału obsadowego. Jest to element bardzo istotny, ponieważ wiadomo że u tego gatunku nie istnieje element samoodtworzenia populacji, spośród osobników młodocianych, podlegających naturalnym wędrówkom z Morza Sargassowego. Oznacza to, że powodzenie ustabilizowania zasobów węgorza w środowisku naturalnym zależy tylko i wyłącznie od skuteczności realizacji planów zarybieniowych. Pełną odpowiedzialność za jakość i kondycję zdrowotną ponoszą więc ośrodki zajmujące się hodowlą materiału zarybieniowego węgorza i to na nich spoczywa obowiązek dbania o jakość materiału, który trafia do wód otwartych.



Tuan Thuc Nguyen



Olsztyn, dnia 20.11.2017

Dr hab. inż. Dorota Fopp-Bayat, prof. UWM
Katedra Ichtiologii
Wydział Nauk o Środowisku
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Ul. Oczapowskiego 5; 10-719 Olsztyn
Tel.: 089 5234772
e-mail: foppik@uwm.edu.pl

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr inż. Tuc Tuana Nguyen, stanowiącej zbiór publikacji nt.: „Detekcja i transmisja herpesvirusa anguillae (AngHV-1) na terenie północno-zachodniej Polski z uwzględnieniem zaleceń dla gospodarowania zasobami węgorza europejskiego *Anguilla anguilla*”; tytuł oryginalny rozprawy doktorskiej w języku angielskim: „Detection of *Herpesvirus anguillae* (AngHV1) in north-western Poland – a new challenge for the existing stock management recommendations for the European eel (*Anguilla anguilla*)”.

Zastosowanie analiz molekularnych jest niezwykle ważne w diagnostyce chorób ryb, a szczególnie istotne podczas identyfikacji chorób wirusowych. Warto podkreślić, że diagnostyka chorób wirusowych z zastosowaniem analiz genetycznych umożliwia nie tylko rozpoznanie patogenów u osobników zarażonych i nosicieli (u których nie obserwuje się bezpośrednich zmian związanych z infekcją), ale również jest kluczowa w identyfikacji ryb (stad/populacji) wolnych od wirusów.

W Polsce diagnostyka chorób wirusowych ryb przy zastosowaniu metod molekularnych jest stosowana głównie w przypadku infekcji wirusowych ryb łososiowatych (np.: wirusowa posocznica krwotoczna - VHS, martwica układu krwiotwórczego - IHN) i karpowatych (np.: wirus herpes u karpia Koi - KHV), natomiast dla wielu gatunków ryb nie opracowano oraz nie wdrożono metod analitycznych (z zastosowaniem analiz genetycznych), umożliwiających diagnostykę specyficznych wirusów. Przykładem gatunku, dla którego brakowało odpowiednich protokołów analitycznych, umożliwiających jednoznaczną diagnostykę chorób wirusowych jest węgorz. Jednak szczęśliwie, Zespół badawczy pod kierunkiem Pani dr hab. inż. Jolanty Kiełpińskiej, prof. nadzw. wypełnił „lukę diagnostyczną” i rozpoczął badania w kierunku identyfikacji chorób wirusowych węgorza,

występującego zarówno w gospodarstwach rybackich jak również zasiedlającego wody Polski północno-zachodniej. Głównym i jednocześnie najważniejszym wynikiem tych badań było przygotowanie przez Pana mgr inż. Tuc Tuana Nguen rozprawy doktorskiej pt.: „Detekcja i transmisja herpeswirusa anguillae (AngHV-1) na terenie północno-zachodniej Polski z uwzględnieniem zaleceń dla gospodarowania zasobami węgorza europejskiego *Anguilla anguilla*”.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska wpisuje się doskonale w nurt badawczy dotyczący diagnostyki oraz zwalczania chorób ryb i stanowi istotną wartość w zakresie etiologii i epidemiologii zakażeń oraz transmisji horyzontalnej *Herpesvirus anguillae* (AngHV-1). Warto wspomnieć, iż oprócz ogromnej wartości poznawczej prezentowanych badań ważne jest praktyczne znaczenie opracowanych procedur badawczych oraz potrzeba wdrożenia ich do „praktyki rybackiej” oraz „gospodarki zarybieniowej”.

Rozprawę doktorską mgr inż. Tuc Tuana Nguen stanowi spójny tematycznie cykl trzech publikacji opatrzoney wspólnym tytułem „Detection of *Herpesvirus anguillae* (AngHV-1) in north-western Poland – a new challenge for the existing stock management recommendations for the European eel (*Anguilla anguilla*)”. W skład cyklu wchodzi trzy następujące publikacje oryginalne:

1. Nguyen T.T., Kempter J., Panicz R. 2016. Monitoring of *Herpesvirus anguillae* (AngHV-1) infections of European eel in north-west Poland. *Medycyna Weterynaryjna (Veterinary Medicine)*, 72 (9), 564-566.
2. Nguyen T.T., Kempter J., Panicz R. 2016. Dynamics of *Herpesvirus anguillae* (AngHV1) transmission by the native ichthyofauna of north-western Poland. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities* 2016, Volume 1 Issue 4.
3. Nguyen T.T., Yeonhwa J., Kiełpińska J., Bergmann S.M., Lenk M., Panicz R. 2017. Detection of *Herpesvirus anguillae* (AngHV-1) in European eel (*Anguilla anguilla*) originating from northern Poland – assessment of sustainability of selected diagnostic methods. *Journal of Fish Diseases* DOI: 10.1111/jfd.12689.

W przedstawionym cyklu prac naukowych, opublikowanym w latach 2016-2017, dwie prace zostały wydane w czasopismach z listy A MNiSzW, posiadających współczynnik wpływu Impact Factor: *Medycyna Weterynaryjna (Veterinary Medicine)* i *Journal of Fish Diseases*, natomiast pozostała praca została opublikowana w czasopiśmie z listy B MNiSzW: *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*. Sumaryczny Impact Factor prac tego cyklu publikacji wynosi 2,3, a łączna liczba punktów MNiSzW wynosi 57. Wszystkie prace są opracowaniami zbiorowymi, w których doktorant jest pierwszym autorem, a Jego wkład pracy w ich powstanie został określony odpowiednio na 70%, 80% i 50%, co znalazło potwierdzenie w stosownych oświadczeniach współautorów.

Tematyka publikacji wchodzących w skład cyklu jest merytorycznie spójna i dotyczy trzech głównych zagadnień: 1) Identyfikacji *Herpesvirus anguillae* (AngHV-1) u osobników węgorza europejskiego *Anguilla anguilla* z terenu północno-zachodniej Polski; 2) Analizy możliwej transmisji horyzontalnej AngHV-1 przy udziale pięciu gatunków ryb, występujących w środowisku naturalnym lub gospodarstwach rybackich (karasia srebrzystego, okonia, sandacza, sterleta i babki byczej; oraz 3) Doboru optymalnej metody analitycznej, umożliwiającej pewną diagnozę zakażenia węgorza europejskiego wirusem AngHV-1.

Opracowanie zawierające wyżej wymieniony cykl publikacji, napisane w języku angielskim, liczy 44 strony i obejmuje: Wstęp, Cel pracy, Metodykę badawczą, Wyniki badań, Wnioski i Streszczenie. Na końcu opracowania zamieszczono kopie prac stanowiących rozprawę doktorską wraz z Oświadczeniami Współautorów, potwierdzającymi ich udział procentowy w wymienionych publikacjach.

Tytuł pracy doktorskiej w pełni odpowiada jej treści, a sformułowane cele badawcze uwarunkowały dobór odpowiedniego materiału i metodyki badawczej oraz umożliwiły zrealizowanie zaplanowanych prac badawczych.

W rozdziale „Wstęp” (*ang. Introduction*) doktorant omówił znaczenie węgorza europejskiego w Polsce oraz przedstawił dane dotyczące połowów światowych tego gatunku, wskazując na postępujący spadek połowów w ciągu ostatniego dziesięciolecia. W kolejnym podrozdziale doktorant omówił zagadnienia dotyczące chorób wirusowych węgorzy oraz scharakteryzował występowanie i znaczenie czterech najważniejszych chorób wirusowych węgorzy: *Herpesvirus anguillae* (AngHV-1), Eel Virus European X (EVEX), Eel Virus European (EVE) oraz Eel Virus American (EVA). Szczególną uwagę doktorant zwrócił na kliniczne znaczenie zakażeń wywołanych przez *Herpesvirus anguillae* AngHV-1 u węgorza europejskiego oraz związaną z tym konieczność doskonalenia diagnostyki laboratoryjnej w kierunku skutecznego wykrywania tego wirusa. W rozdziale tym autor zawarł również zagadnienia dotyczące transmisji horyzontalnej i wertykalnej wirusów, zwracając szczególną uwagę na transmisję horyzontalną, oraz grupę „nosicieli wirusów” wśród której można wyróżnić wiele gatunków ryb oraz bezkręgowców wodnych.

Głównym celem ocenianej pracy doktorskiej była analiza stopnia zagrożenia węgorza europejskiego związanego z występowaniem choroby wirusowej wywołanej przez *Herpesvirus anguillae* (AngHV-1).

Szczegółowe cele pracy zostały sformułowane następująco:

1. Detekcja *Herpesvirus anguillae* (AngHV-1) u węgorza na terenie Polski północno-zachodniej;
2. Zidentyfikowanie potencjalnych nosicieli wirusa AngHV-1 w obrębie rodzimej ichtiofauny, stanowiących źródło zakażeń w środowisku wodnym;

3. Dobór optymalnych metod oraz odpowiednich prób tkanek węgorza w skutecznej diagnostyce AngHV-1 u węgorza europejskiego;
4. Opracowanie wytycznych dla podmiotów prowadzących podchów węgorza europejskiego oraz dla ośrodków realizujących zarybienia wód otwartych.

W rozdziale „Metodyka badań wirusologicznych” (*ang. Methodology of virusological tests*) autor przedstawił możliwości zastosowania wybranych analiz molekularnych, umożliwiających identyfikację wirusów. Dodatkowo omówił metody poboru prób w postaci fragmentów tkanek lub wymazów stosowane w diagnostyce chorób wirusowych u węgorza. Wydaje się, że tego typu opracowanie rozprawy doktorskiej, związanej bezpośrednio z zastosowaniem metod molekularnych, powinno zawierać opis metod badawczych stosowanych w trakcie realizacji przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej. Prawdopodobnie doktorant stwierdził, iż wystarczy opis metodyki zawarty w cyklu publikacji naukowych, stanowiących rozprawę doktorską.

W rozdziale „Wyniki badań” (*ang. Results of studies*) doktorant opisał w stosunkowo syntetycznej formie, najważniejsze wyniki badań z opublikowanych trzech artykułów, wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. W rozdziale tym omówił identyfikację *Herpesvirus anguillae* AngHV-1 przy zastosowaniu dwóch metod izolacji DNA oraz porównał je i wskazał optymalną metodę izolacji opisaną jako „Column method”. Interesujący jest fakt zastosowania w kolejnych badaniach (opisanych w trzeciej publikacji) dodatkowej metody (przy zastosowaniu zestawu QiaAmp DNA Mini Kit, Qiagen), pomimo wcześniej dobranej odpowiedniej metody izolacji DNA. Prosiłabym o wyjaśnienie tego podejścia badawczego.

W kolejnej części rozdziału „Wyniki badań” doktorant przedstawił transmisję horyzontalną wirusa AngHV-1 oraz omówił wyniki badań, uwzględniające wykrycie tego wirusa u 17 osobników pięciu gatunków ryb (włączając: karasia srebrzystego, okonia europejskiego, sandacza, sterleta oraz babki byczej), stanowiących „wektory zakażeń” w środowisku naturalnym. Ostatnia część rozdziału „Wyniki badań” zawiera informację na temat potrzeby opracowania nowych metod diagnostycznych, umożliwiających pewną i skuteczną diagnostykę wirusologiczną, eliminującą „błędną-negatywną weryfikację” wirusów. W tej części opracowania Autor porównuje diagnostykę wirusologiczną przy zastosowaniu konwencjonalnej reakcji PCR oraz analizę z wykorzystaniem zagnieżdżonej reakcji PCR tzw. „nested PCR”, wskazując bardziej efektywną metodę analizy „nested PCR”. Autor udowodnił, iż zastosowanie metody „nested PCR” zwiększa skuteczność identyfikacji AngHV-1 u węgorza do 93,3%. Dodatkowo autor eksperymentalnie wykazał, że próby pobrane ze skóry oraz skrzeli stanowią najlepszy „zewnętrzny” materiał badawczy w tego typu analizach, podkreślając brak konieczności pobierania prób z organów wewnętrznych.

Oceniając omawianą część rozdziału „Wyniki” na stronie 16 zauważyłam wzmiankę o zastosowaniu metody hybrydyzacji in situ, natomiast nie znalazłam wyników tych badań. Prosiłabym o wyjaśnienie tego faktu. Dodatkowo chciałabym uzyskać informację o długości amplifikowanych fragmentów DNA przy zastosowaniu metody „nested PCR”.

W przedstawionym do oceny Opracowaniu pracy doktorskiej można znaleźć informacje na temat zrealizowania prawie wszystkich zamierzonych celów badawczych z wyjątkiem ostatniego, dotyczącego „pracowania wytycznych dla podmiotów prowadzących podchów węgorza europejskiego oraz dla ośrodków realizujących zarybienia wód otwartych”. Chociaż w dołączonym cyklu publikacji naukowych pewne zalecenia zostały pośrednio ujęte, to bardziej wartościowe byłoby przedstawienie ich w postaci szczegółowego zestawienia w Opracowaniu.

Zwieńczeniem rozprawy doktorskiej mgr inż. Tuc Tuana Nguyen jest sześć dobrze sformułowanych wniosków, które są zasadne, wyczerpujące i wynikają bezpośrednio z uzyskanych w trakcie badań wyników.

Przedstawione do recenzji Opracowanie pracy doktorskiej zawiera rozdział „Streszczenie” (*ang. Summary*), które w zasadzie jest podsumowaniem Opracowania, a nie Streszczeniem rozprawy doktorskiej. Prosiłabym o wyjaśnienie czy taka forma Opracowania rozprawy doktorskiej (bez streszczenia) jest bezpośrednio związana z wymaganiami formalnymi Wydziału Nauk o Żywności i Rybactwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie ?

Doktorant w Opracowaniu uwzględnił również rozdział „Spis literatury”, złożony z 26 pozycji dobrze dobranego, nienumerowanego piśmiennictwa zagranicznego i krajowego. Pragnę zwrócić uwagę na fakt, iż w „Spisie literatury” znajdują się 2 pozycje, których autor nie zacytował w opracowaniu: Kempter i inni 2012 oraz Kiełpiński i inni 2010. Ponadto w „Spisie literatury” brakuje dziewięciu pozycji literaturowych zacytowanych w Opracowaniu:

- str. 8 – Chang (2002), Sano (1990), Ueno et al. 1992;
- str. 9 – Bekesi et al. 1986, van Gineken et al. 2004, Sano 1976, Sano 1977;
- str. 10 – Siwicki 1994;
- str. 12 – Bergmann 2017.

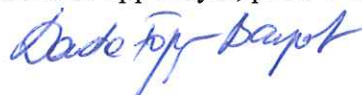
Drobne błędy, wymagające korekty, dostrzegłam również w cytowaniu piśmiennictwa:

- str. 8 – jest Castric (1980); w spisie literatury – Castric and Chastel 1980,
- str. 8 – jest Sano 1981; w spisie literatury – Sano et al. 1981,
- str. 9 – Galinier et al. 2012; w spisie literatury – Galiniert et al. 2012,
- str. 9 – Beurden 2012; w spisie literatury – Buerden 2012,
- str. 9 – Okazaki et al. 2016; w spisie literatury – Okazaki et al. 2016a.

Przytoczone nieliczne uwagi mają charakter dyskusyjny, a głównie korektorski i w niczym nie umniejszają bardzo wysokiej wartości naukowej rozprawy doktorskiej mgr inż. Tuc Tuana Nguyen.

Sumując uważam, że przedstawiona do oceny praca doktorska pana mgr inż. Tuc Tuana Nguyen posiada właściwą konstrukcję, przyjętą w tego rodzaju opracowaniach a zastosowane metody diagnostyczne świadczą o bardzo dobrym opanowaniu nowoczesnych analiz molekularnych. Uzyskane wyniki wnoszą wiele nowych informacji o charakterze poznawczym i użytkowym. Biorąc pod uwagę wartość merytoryczną pracy, jej oryginalność oraz wartości poznawcze i użytkowe oświadczam, iż praca pt.: „Detekcja i transmisja herpesvirusa anguillae (AngHV1) na terenie północno-zachodniej Polski z uwzględnieniem zaleceń dla gospodarowania zasobami węgorza europejskiego *Anguilla anguilla*” w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim, zgodnie z aktualnie obowiązującą Ustawą o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym (zgodnie z art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r.; Dz. Ustaw Nr 65, poz. 595 z późn. zm.). W związku z tym przedkładaam Wysokiej Radzie Wydziału Nauk o Żywności i Rybactwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie wniosek o dopuszczenie mgr inż. Tuc Tuana Nguyen do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Dorota Fopp-Bayat, prof. UWM



Review of the doctoral dissertation of mgr inż. Tuc Tuan Nguyen, constituting a series of publications regarding: "Detection of Herpesvirus anguillae (AngHV-1) in north-western Poland, taking into account recommendations for the implementation of the European eel (*Anguilla anguilla*) stock management plan." „Deteetion of Herpesvirus anguiikw (AngHV1) in north-western Poland — a new challenge for the existing stock management recommendations for the European cel (*Anguilla anguifia*)".

Use of molecular analysis is extremely important in the diagnostics of fish diseases, and particularly important in identifying viral diseases. It should be emphasized that the diagnostics of viral diseases using genetic analysis allow not only identification of pathogens in infected individuals and carriers (in which no direct changes associated with the infection are observed), but is also critical in the identification of fish (herds/populations) free from viruses.

In Poland, the diagnostics of viral diseases of fish using molecular methods are mainly used for viral infections in salmonids (e.g., viral haemorrhagic septicaemia—VHS, infectious haematopoietic necrosis—IHN) and cyprinids (e.g., Koi herpes virus—KHV), while for many species no analytical methods (using genetic analysis) allowing diagnostics of specific viruses have been developed or implemented. Among the species for which there was lack of appropriate analytical protocols for unambiguous diagnostics of viral diseases is eel. Fortunately, the research group led by Prof. Jolanta Kiełpińska, has filled the "diagnostic gap" and initiated studies for the identification of viral diseases of eel both reared in fish farms and inhabiting the waters of north-western Poland. The main and most important consequence of these studies was preparation by mgr inż. Tuc Tuan Nguyen of the doctoral dissertation titled "Detection of Herpesvirus anguillae (AngHV-1) in north-western Poland, taking into account recommendations for the implementation of the European eel (*Anguilla anguilla*) stock management plan."

The doctoral dissertation submitted for review is fully integrated with the current research of the diagnostics and control of fish diseases, and is an important asset in the studies of the aetiology and epidemiology of infections and horizontal transmission of Herpesvirus anguillae (AngHV-1). It is worth mentioning that in addition to the high value of the presented studies in terms of knowledge expansion, very important is also the practical aspect of the developed examination procedures and the need to implement them into "fishing practice" and "stock management".

The doctoral dissertation of mgr inż. Tuc Tuan Nguyen represents a thematically coherent series of three publications titled "Detection of Herpesvirus anguillae (AngHV-1) in north-western Poland, taking into account recommendations for the implementation of the European eel (*Anguilla anguilla*) stock management plan". The series consists of the following three original papers:

1. Nguyen T.T., Kempter J., Panicz R. 2016. Monitoring of Herpesvirus anguillae (AngHV-1) infections of European eel in north-west Poland. *Medycyna Weterynaryjna (Veterinary Medicine)*, 72 (9), 564-566.
2. Nguyen T.T., Kempter J., Panicz R. 2016. Dynamics of Herpesvirus anguillae (AngHV-1) transmission by the native ichthyofauna of north-western Poland. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities* 2016, Volume 1 Issue 4.
3. Nguyen T.T., Yeonliwa J., Kiełpińska J., Bergmann S.M., Lenk M., Panicz R. 2017. Detection of Herpesvirus anguillae (AngHV-1) in European eel (*Anguilla anguilla*) originating from northern Poland—assessment of sustainability of selected diagnostic methods. *Journal of Fish Diseases* DOI: 10.1111/jfd.12689.

In the presented series of scientific papers published in 2016–2017, two works were published in journals from the A list of the Ministry of Science and Higher Education, having an Impact Factor: *Medycyna Weterynaryjna* (Veterinary Medicine) and *Journal of Fish Diseases*, and the remaining paper was published in a journal from the B list: *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*. The total Impact Factor of the papers from this series is 2.3, and the total number of the Ministry of Science and Higher Education points is 57. All the studies were group works, of which the doctoral candidate was the first author, and his contribution was reported as 70%, 80% and 50%, respectively, which was confirmed in relevant statements from the other contributors.

The topics of the publications within the series are consistent and regard three main issues: 1) Identification of *Herpesvirus anguillae* (AngHV-1) in European eel (*Anguilla anguilla*) individuals in north-western Poland; 2) Analysis of possible horizontal transmission of AngHV-1 in five fish species occurring in the natural environment or fish farms (Prussian carp, perch, zander, sterlet and round goby); and 3) Selection of the optimum analytical method for diagnosing AngHV-1 infection in European eel.

The publication containing the above-mentioned series of papers is written in English, has 44 pages, and includes: Introduction, Aim of work. Methods, Results of studies. Conclusions and Summary. Copies of papers constituting this doctoral dissertation, together with Co-Authors' Statements confirming their percentage of contribution to the listed works, are provided at the end of the document.

The title of the doctoral dissertation corresponds fully to its content, and the defined research objectives have guided the selection of suitable material and research methods, as well as enabled conducting the planned research activities.

In the Introduction section, the doctoral candidate discussed the importance of European eel in Poland and presented data on the world catches of this species, indicating the progressive decline in the catches over the last decade. In the following section, the doctoral candidate discussed issues concerning viral diseases of eel and described the occurrence and the importance of the four major viral diseases of eel: *Herpesvirus anguillae* (AngHV-1), Eel Virus European X (EVEX), Eel Virus European (EVE) and Eel Virus American (EVA). Particular attention was paid to the clinical significance of infections caused by *Herpesvirus anguillae* AngHV-1 in European eel, and thus the need to improve laboratory diagnostics for an effective detection of the virus. In this section, the author also included issues concerning horizontal and vertical transmission of viruses, paying particular attention to horizontal transmission, and a group of "virus carriers", among which many species of fish and aquatic invertebrates can be distinguished.

The main aim of the reviewed doctoral dissertation was to analyse the degree of the threat to European eel associated with the viral disease caused by *Herpesvirus anguillae* (AngHV-1).

The detailed aims of the work were set out as follows:

1. Detection of *Herpesvirus anguillae* (AngHV-1) in eel from north-western Poland;
2. Identification of potential AngHV-1 vectors in the indigenous ichthyofauna that are the source of infection in the aquatic environment;
3. Selection of optimal methods and appropriate samples of eel tissues for the effective diagnostics of AngHV-1 infection in European eel;

4. Development of guidelines for institutions that conduct pre-rearing of European eel and restocking centres operating in open waters.

In the section titled "Methodology of virological tests", the author introduced the possible implementations of selected molecular analyses to enable identification of viruses. Moreover, the author discussed the sampling methods based on tissue fragments or swabs that are used in the diagnostics of viral diseases of eel. It seems that this approach to the dissertation, directly involving the use of molecular methods, should include description of the research methods used during the studies for the presented dissertation. Probably, the candidate presumed that the methodology descriptions included in the series of scientific publications, constituting his doctoral dissertation, were sufficient.

In the section "Results of studies", the candidate described in a relatively concise manner the main findings of the studies included in three published articles that were part of his dissertation. Further in this chapter, the identification of Herpesvirus anguillae (AngHV-1) using two methods of DNA isolation was described and compared, and the optimal isolation method described as the "Column method" was indicated. Interesting is that in subsequent studies (described in the third publication), an additional method (using the QiaAmp DNA Mini Kit, Qiagen) was used despite the previous selection of the optimal DNA isolation method. Please clarify this approach.

In the following part of the section "Results of studies", the candidate presented the horizontal transmission of AngHV-1 and discussed the results of studies, taking into account the detection of this virus in 17 individuals of five fish species (including Prussian carp, perch, zander, sterlet and round goby) that constituted the "vectors of infection" in the natural environment. The last part of the section "Results of studies" contains information about the need to develop new diagnostic methods that would allow a high level of certainty and effectiveness of viral diagnostics and eliminate "false negative verification" of the presence of viruses. In this part of his work, the author compared virological diagnostics using conventional PCR and analysis using the "nested PCR" method, indicating the latter as a more efficient method of analysis. The author demonstrated that using "nested PCR" increases the efficiency of AngHV-1 identification in eel to 93.3%. Moreover, the author experimentally demonstrated that samples taken from the skin and gills are the best "external" study material in this type of analyses, stressing no need for taking samples of internal organs.

While reviewing this part of the "Results" section on page 16, I noticed the author had mentioned the use of *in situ* hybridization, but I did not find the results of such analyses. Please explain this finding. Moreover, I would like to obtain information about the size of the amplified DNA fragments using "nested PCR."

In the article thesis submitted for review there is information about obtaining almost all intended study aims except the last one that regarded "development of guidelines for institutions that conduct pre-rearing of European eel and restocking centres operating in open waters." Although in the submitted series of scientific publications some recommendations were indirectly included, it would be more valuable to present them in the form of a detailed list in the thesis.

The doctoral dissertation of mgr inż. Tuc Tuan Nguyen is concluded with six well-written conclusions that are justified and comprehensive, and derive directly from the obtained results of studies.

The article thesis submitted for review contains the section "Summary" which actually is a concluding fragment of this article thesis and not a summary of the doctoral dissertation. Please clarify whether this article thesis form of doctoral dissertation (without the summary) is directly associated with the formal requirements of the Faculty of Food Sciences and Fisheries, University of Agriculture in Szczecin.

The candidate also included the section "List of references" containing 26 items of well-composed, unnumbered foreign and domestic literature references. I would like to point out that the "List of references" includes two items that the author did not cite in the thesis: Kempter et al. 2012 and Kiełpiński et al. 2010. Moreover, the "List of references" lacks nine items cited in the thesis:

- p. 8—Chang (2002), Sano (1990), Ucno et al. (1992);
- p. 9—Bekesi et al. (1986), van Gineken et al. (2004), Sano (1976), Sano (1977);
- p. 10—Siwicki (1994);
- p. 12—Bergmann (2017).

I also noticed minor errors that require correction in the following citations:

- p. 8—Castric (1980) in the text, and Castric and Chastel (1980) in the list of references;
- p. 8—Sano (1981) in the text, and Sano et al. (1981) in the list of references;
- p. 9—Galinier et al. (2012) in the text, and Galiniert et al. (2012) in the list of references;
- p. 9—Beurden (2012) in the text, and Buerden (2012) in the list of references;
- p. 9—Okazaki et al. (2016) in the text, and Okazaki et al. (2016a) in the list of references.

The few remarks mentioned here are aimed to incite a discussion and are mainly of corrective nature, and do not in any way undermine the very high scientific value of mgr inż. Tuc Tuan Nguyen's doctoral dissertation.

To sum up, I believe that the doctoral dissertation by mgr inż. Tuc Tuan Nguyen submitted for review has an appropriate design that is adopted in this type of documents, and the implemented diagnostic methods are proof of a brilliant knowledge of modern methods of molecular analysis. The obtained results provide a considerable amount of new information in terms of knowledge expansion and utility. Taking into account the substantive quality of the work, its originality and value in terms of knowledge expansion and utility, I declare that the dissertation titled: "Detection of Herpesvirus anguillae (AngHV-1) in north-western Poland, taking into account recommendations for the implementation of the European eel (*Anguilla anguilla*) stock management plan" fully conforms with the requirements of doctoral dissertations in accordance with the current Act on the Academic Degrees and Academic Titles (Article 13 of the Act of 14 March 2003; Dz. Ustaw (Reg. of Acts) no. 65, item 595, as amended). Therefore, I am submitting to the High Council of the Faculty of Food Sciences and Fisheries, University of Agriculture in Szczecin a request for progressing mgr inż. Tuc Tuan Nguyen to further stages of the PhD degree conferral procedure.

Dr hab. inż. Dorota Fopp-Bayat, prof. UWM

Prof. dr hab. Wojciech Piasecki
Zakład Paleooceanologii
Wydział Nauk o Ziemi
Uniwersytet Szczeciński
ul. Adama Mickiewicza 16
70-383 Szczecin,

**Report on doctoral thesis
of Mr. Thuc Tuan Nguyen
entitled**

**Detection of herpesvirus anguillae (AngHV-1) in north-western Poland—a new
challenge for the existing stock management recommendations for the European eel
(*Anguilla anguilla*)**

The dissertation, I received for review is a compilation thesis, known also as a “thesis by publication” or “essay thesis”. This form of a doctoral dissertation is quite unusual in Poland, but it is very common in Scandinavia and countries like Canada. The major difference between a regular descriptive thesis and a compilation thesis is a concise appearance of the latter. Therefore I am not surprised that the dissertation under scrutiny has only 44 pages. Its major and the most important part are three papers published in international journals, such as *Medycyna Weterynaryjna*, *EJPAU*, and *Journal of Fish Diseases*. In all three cases, Mr Nguyen is the first author and the supervisors (Kempter/Kiełpińska and Panicz) are subsequent authors. Only in the third publication, there are three additional authors from the Loeffler Institute, Insel Riems, Germany. These individual publications are bound and supplied with introductory chapters (otherwise known as kappa). Such structure is one of the widely used options, while some universities prefer a separate (short) introduction and interconnecting chapters between individual published papers. Anyway, as I said before this form of the thesis is relatively new for Poland and therefore it is difficult to relate its structure and form to an established Polish standard.

The title of this dissertation well reflects its contents and this title is a good universal statement combining titles of three published papers and also adding some explanation about the meaning of these studies and their practical importance. This title also helps to understand why the author decided to present his findings not in the form of a traditional descriptive thesis but in the form of a compilation of published papers. I understand that the progress of science in some disciplines such molecular biology and veterinary virology is so fast that important results must be promptly published (without the intermediary step of a traditional thesis which is not a publication). The reason for that is not only the urge for keeping the priority in announcing certain findings but it also has a practical aspect of instant communicating of the results to the fisheries and aquaculture practice. There is a public demand for such prompt knowledge transfer.

The two key elements of this thesis are the European eel (*Anguilla anguilla*) and one of its pathogens—herpesvirus anguillae (AngHV-1). The European eel is an economically important species not only in Poland but also in a global perspective. Its stocks have been dwindling for decades and even though the fish has been considered “critically endangered” by the IUCN Red List of Threatened Species—eel has still been captured and consumed in all European countries including Poland. In 2007 the “Council Regulation (EC) No 1100/2007 of 18 September 2007 establishing measures for the recovery of the stock of European eel” obliged members states for developing local management plans for eel. Such management plan was published in 2008 and it is a binding document for the authorities as well as for all

entities dealing with eel. Unfortunately, this otherwise comprehensive document covering 89 pages of print devoted very little attention to eel pathogens (just 1/3 of a page). The authors concluded that despite detailed studies carried out by them no viral or bacterial pathogens were found in eel in Poland! On the other hand, it is commonly known that viral diseases are capable of causing very serious and economically devastating fish mortalities—see the example of KHV in carp. It was also evident that European eel is susceptible to a number of serious viral diseases. The authors of the Polish management plan also marginalized the fact that numerous fish species can be asymptomatic carriers of viruses, which makes the epidemiological situation even more complex.

Mr Nguyen guided by his supervisors, based on earlier preliminary studies, decided to challenge the simplified and superficial statements of the official management plan for eel in Poland. The studies of Kempter et al. (2014) indicated that indeed herpesvirus anguillae (AngHV-1) is present also in Poland. In view of the above, Mr Nguyen decided to

- 1) conduct detailed studied on eel in north-western Poland to assess the magnitude of the threat,
- 2) to determine vector organisms,
- 3) to find optimum diagnostic methods, and finally
- 4) to propose new guidelines to manage the problem.

Those individual aims of the thesis were addresses in three, earlier mentioned published papers.

Doing this review I will address separately the journal articles and the introductory chapters (kappa), although I believe that the articles are more important.

The first paper included in this thesis was published in *Medycyna Weterynaryjna*—a renown international journal, which used to have an impact factor in the past. The paper is entitled “Monitoring of herpesvirus anguillae (AngHV-1) infections in the European eel in north-west Poland”. The authors collected eels from six sample sites in Poland and Denmark. The sites represented open waters as well as aquaculture prerearing facilities. A total of 256 samples collected from gills, liver, kidney, spleen, intestine, and heart were analysed using two different molecular techniques. Only one (of six) sites was free from infection and in general 77 samples out of 256 were AngHV-1-positive (or 51/256 according to another method, DNazol). The highest percentage of asymptomatic carriers was found in eels imported from Denmark for the purpose of prerearing and reintroduction. The eels collected in natural waters demonstrated AngHV-1 infection rate of 30% (Dąbie Lake) and 40% (Trzebież). The authors concluded that a strict monitoring for the presence of AngHV-1 is needed in Poland. This paper is important because it contradicts the official documents and recommendations and by doing that raises public awareness about possible mortality cases inflicted by the virus.

The second paper consequently explores the problem even further by answering the question: Are there any asymptomatic carriers of AngHV-1 among Polish freshwater fish species? The paper is entitled “Presence of herpesvirus anguillae (AngHV1) DNA in the native ichthyofauna of north-western Poland” and it was published in *EJPAU* (Electronic Journal of Polish Agriculture Universities). This study covered 332 fish specimens representing 20 species collected at six locations in Poland. The locations were either form freshwater sites (5 locations) or brackish water (Baltic Sea). The molecular analyses were positive in 17 cases and the virus carriers were: Prussian carp, *Carassius gibelio* (2 cases), European Perch, *Perca fluviatilis* (2 cases), pikeperch, *Stizostedion lucioperca* (2 cases), sterlet *Acipenser ruthenus* (5 cases), and round goby, *Neogobius melanostomus* (6 cases).

Even though the overall prevalence seems to be very low, we should not underestimate the epizootic potential of the detected asymptomatic carriers and their ability to inflict very costly mortalities by spreading the virus to numerous eels. The highest number of positive

cases was found for round goby which would make the vertical transmission of herpesvirus anguillae quite possible because this small fish can be an easy prey for eel.

The third paper in this thesis was entitled "Detection of herpesvirus anguillae (AngHV-1) in European eel originating from northern Poland – assessment of suitability of selected diagnostic methods" was published in *Journal of Fish Diseases*, an influential international journal with high impact factor. The main objective of this study was to optimize diagnostic methods for detection of herpesvirus anguillae using conventional PCR, nested PCR, and in situ hybridization assay. Also, eel kidney cells (EK-1, No. 809) were cultivated in three passages after being infected by the filtrates of the eel organ pools. The material was collected from a single site and the total number of eels analysed was 15. Tissues of gills, skin, heart, kidney, and spleen, were examined separately as well as pooled samples. The obtained results indicated that only 53.3% of the individual organ samples were positive for AngHV-1 by PCR, while the nested PCR demonstrated that the actual prevalence was 93.3%. In the cell cultivation passages, no cytopathic effect was visible in the first two rounds, but it was detected in the third passage. This positive result was visible only while using the nested PCR technique.

It turned out that the most suitable for AngHV-1 detection were skin and gills while samples pooled before DNA extraction were of a very limited usefulness. This result may have very practical implications because the process of eel screening for the virus does not require killing the fish.

This paper also discussed options for new management guidelines for the eel populations in Poland, adhering to the more general recommendation of the EU. The authors indicated the need for the introduction of obligatory tests of juvenile eel intended for restocking purposes for the detection of herpesvirus anguillae (AngHV-1). They also suggested that changes are needed at the level of the EU in the form of limiting the free, unverified circulation of restocking fish between rearing centres.

Some aspects of the evaluated published articles forming this thesis, in my opinion, require additional elaboration or correction.

Paper 1

Eel sampling groups were not identified in terms of their size. Therefore it might affect the comparison of the results. We know that the mortality rate of the smallest fish is usually very high. On the other hand, the group of the biggest ones is usually less infected because those which contracted the disease died and those that we can see in the sample are survivors, usually with acquired immunity. With such approach, we are losing one of the important parameters in the discussion – the fish size. I was not able to find information in this paper whether the studied fish exhibited any clinical signs that could be attributed to AngHV1? The Materials and Methods section is quite chaotic and it contains terms that require explanation (e.g., what are "Gill slices"?). Information is missing (in all three papers) about management recommendations in other EU countries. Are they similarly liberal as those in Poland or perhaps more restrictive?

Paper 2

The legal status of the Polish "Management recommendations" should be more explicitly explained. Please explain what legal steps and/or procedures are needed to modify the existing recommendations?

Paper 3

All 15 eels were kept together for three days. Could this affect the results? Could such cohabitation increase the infection rate?

The introductory chapters (kappa) well summarize the results of the three publications. They also provide additional details that help to understand the importance of those studies

and to assess their value. Those additional chapters are: "Aim of work", "Conclusions", and "Summary". The aims of this thesis are in my opinion well designed and expressed and as a reviewer, I can say that those aims were well addressed in this thesis. The conclusions, however, contain not only four conclusions, but also two recommendations. I can see a major problem with the chapter "Summary". Surprisingly, this four-paragraph chapter contains three paragraphs which are irrelevant and could be more justified in a "Discussion". This would, however, cause an additional problem because the kappa does not contain a "Discussion" chapter!

The major linguistic or editorial problem of the kappa is the scarce usage of articles (the, a). I noticed also a strange literature citation "(Med. Weter. 2017, 71(2), pp. 565)".

Summing up, I would like to say that the author pursued an interesting problem with important practical aspects. The studies were well organized and executed. The results were promptly published in three journals of international circulation. The individual papers forming this compilation thesis have been assessed by journal reviewers, so my opinion as an additional "post-factum-reviewer" relates in lower extent to the details but it relates mainly to the overall image of the set of three articles. Despite some deficiencies mentioned earlier, my opinion about this thesis is positive. I also hope that some doubts mentioned in my review will be cleared during the public defence of this thesis.

I solemnly declare herewith that in my opinion the doctoral dissertation of Mr Tuan Thuc Nguyen complies with the requirements of the Act on Academic Title and Degree of the Republic of Poland and therefore, I kindly ask the faculty Council of Food Science and Fisheries to allow Mr Tuan Thuc Nguyen to proceed with subsequent steps of the doctoral procedure.

Done at Szczecin, 19 November 2017



Prof. dr hab. Wojciech Piasecki

Prof. dr hab. Wojciech Piasecki
Zakład Paleooceanologii
Wydział Nauk o Ziemi
Uniwersytet Szczeciński
ul. Adama Mickiewicza 16
70-383 Szczecin

**Sprawozdanie dot. pracy doktorskiej
P. Thuca Tuana Nguyena
pt.**

**„Detekcja i transmisja herpesvirusa anguillae (AngHV-1) na terenie północno-
zachodniej Polski z uwzględnieniem zaleceń dla gospodarowania zasobami węgorza
europejskiego (*Anguilla anguilla*)”**

Otrzymana przeze mnie do recenzji praca doktorska jest zbiorem opublikowanych artykułów naukowych zwanym również kompilacją (ang. „thesis by publication” lub „essay thesis”). Taka postać pracy doktorskiej jest dość niezwykła w Polsce, ale bardzo powszechnie stosowana w krajach Skandynawii czy Kanadzie. Główną różnicą między standardową pracą opisową a kompilacją jest zwarta postać tej drugiej. W związku z tym nie jestem zaskoczony faktem, iż poddawana recenzji praca ma jedynie 44 strony. Jej główną i najważniejszą częścią są trzy artykuły opublikowane w międzynarodowych czasopismach, takich jak *Medycyna Weterynaryjna*, *EJPAU* i *Journal of Fish Diseases*. We wszystkich trzech przypadkach p. Nguyen jest pierwszym autorem, a jego opiekunowie (Kempter/Kiełpińska i Panicz) kolejnymi. Tylko w trzeciej publikacji występuje troje dodatkowych autorów z Loeffler Institute, Insel Riems, Niemcy. Poszczególne publikacje są połączone i opatrzone rozdziałami wstępu (znanymi jako „kappa”). Tego typu struktura jest jedną z wielu stosowanych opcji, przy czym niektóre uczelnie preferują oddzielny (krótki) wstęp i rozdziały łącznikowe pomiędzy poszczególnymi publikacjami. Jak jednak wspomniałem wcześniej, taka postać pracy doktorskiej jest względnie nowa w Polsce, dlatego też trudno odnieść jej strukturę i postać do ustalonych w naszym kraju standardów.

Tytuł pracy dobrze odzwierciedla jej zawartość i jest uniwersalną deklaracją łączącą w sobie tytuły trzech publikacji oraz dodatkowe wyjaśnienie dotyczące znaczenia tych badań i ich istotności w praktyce. Tytuł ten pomaga także zrozumieć, dlaczego autor zdecydował się przedstawić swoje wyniki nie w postaci tradycyjnej pracy opisowej, a w postaci kompilacji opublikowanych artykułów. Rozumiem, że postęp w pewnych dyscyplinach nauki, takich jak biologia molekularna i wirusologia weterynaryjna jest tak szybki, że ważne wyniki należy publikować niezwłocznie (bez pośredniego etapu w postaci tradycyjnej rozprawy, która nie jest publikacją). Powodem tego jest nie tylko pośpiech w ogłaszaniu pewnych odkryć, ale również aspekt praktyczny szybkiego przekazywania wyników personelowi gospodarstw hodowlanych i praktykom akwakultury. Istnieje powszechne zapotrzebowanie na taki transfer wiedzy.

Dwoma kluczowymi elementami tej pracy są węgorz europejski (*Anguilla anguilla*) i jeden z jego patogenów — *Herpesvirus anguillae* (AngHV-1). Węgorz europejski jest gatunkiem ważnym ekonomicznie, nie tylko w Polsce, ale i na świecie. Jego zasoby spadają od dziesięcioleci i choć gatunek uznaje się za „krytycznie zagrożony” w czerwonej księdze gatunków zagrożonych IUCN, węgorza wciąż łapie się i konsumuje we wszystkich krajach Europy, w tym w Polsce. W 2007 roku w „Dyrektywie Rady (WE) nr 1100/2007 z dnia 18 września 2007 r. ustanawiającej środki służące odbudowie zasobów węgorza europejskiego” zobowiązano państwa członkowskie do opracowania lokalnych planów gospodarowania

zasobami węgorza. Taki plan opublikowano w 2008 roku i jest on dokumentem wiążącym dla władz oraz wszelkich instytucji zajmujących się węgorzem. Niestety w tym bardzo obszernym dokumencie obejmującym 89 stron wydruku poświęcono bardzo niewiele miejsca patogenom węgorza (jedynie 1/3 strony). Autorzy doszli do wniosku, że pomimo szczegółowych badań, które przeprowadzili, u węgorzy w Polsce nie wykryto żadnych patogenów wirusowych ani bakteryjnych! Z drugiej strony powszechnie wiadomo, że choroby wirusowe mogą powodować bardzo poważną i katastrofalną z gospodarczego punktu widzenia śmiertelność ryb — patrz przykład KHV u karpia. Wykazano również, że węgorz europejski jest podatny na szereg poważnych chorób wirusowych. Autorzy polskiego planu zagospodarowania również zmarginalizowali fakt, że wiele gatunków ryb może być bezobjawowymi nosicielami wirusów, co jeszcze bardziej komplikuje sytuację epidemiologiczną.

Pan Nguyen pod kierunkiem swoich opiekunów, na podstawie wstępnych badań, zdecydował się na podważenie uproszczonych i powierzchownych stwierdzeń oficjalnego planu zagospodarowania zasobów węgorza w Polsce. Badania autorstwa Kempter i wsp. (2014) wskazywały, że wirus *Herpesvirus anguillae* (AngHV-1) jest rzeczywiście obecny w Polsce. W związku z powyższym p. Nguyen zdecydował się na:

- 1) przeprowadzenie szczegółowych badań węgorzy w Polsce północno-zachodniej w celu oceny rozmiaru zagrożenia;
- 2) ustalenie organizmów będących wektorami zakażenia;
- 3) wskazanie optymalnych metod diagnostycznych, a także
- 4) zaproponowanie nowych wytycznych w celu zwalczania problemu.

Poszczególne cele poruszono w trzech wspomnianych wcześniej publikacjach.

W niniejszej recenzji odniosę się osobno do artykułów opublikowanych w czasopiśmie i rozdziałów wstępu (kappa), choć uważam artykuły za bardziej istotne.

Pierwszy artykuł uwzględniony w niniejszej pracy doktorskiej został opublikowany w czasopiśmie *Medycyna Weterynaryjna* — znanym czasopiśmie międzynarodowym, który w przeszłości miał przypisany parametr Impact Factor. Artykuł nosi tytuł „Monitoring of *Herpesvirus anguillae* (AngHV-1) infections in the European eel in north-west Poland”. Autorzy zebrali węgorze z sześciu miejsc poboru prób w Polsce i Danii. Miejsca te były położone na wodach otwartych, jak również w ośrodkach podchowu ryb do akwakultury. Zebrano łącznie 256 próbek ze skrzeli, wątroby, nerek, śledziony, jelita i serca i poddano je analizie z użyciem dwóch różnych technik molekularnych. Tylko jedno (z sześciu) miejsc było wolne od zakażenia i ogólnie 77 z 256 próbek były dodatnie pod względem obecności AngHV-1 (lub 51/256 wg innej metody — DNAzol). Najwyższy odsetek bezobjawowych nosicieli wykryto wśród węgorzy importowanych z Danii w celu podchowu i użycia do zarybień. Węgorze zebrane w wodach naturalnych wykazały odsetek zakażeń wirusem AngHV-1 wynoszący 30% (Jezioro Dąbie) i 40% (Trzebież). Autorzy stwierdzili, że w Polsce konieczne jest ściśle monitorowanie występowania wirusa AngHV-1. Artykuł ten jest ważny, ponieważ przeczy oficjalnym dokumentom i zaleceniom, przez co zwiększa powszechną świadomość dotyczącą możliwych przypadków śmiertelności spowodowanych przez wirusa.

W drugim artykule konsekwentnie zgłębiono problem, odpowiadając na pytanie: Czy bezobjawowi nosiciele wirusa AngHV-1 występują wśród gatunków ryb w wodach słodkich w Polsce? Artykuł nosi tytuł „Presence of *Herpesvirus anguillae* (AngHV-1) DNA in the native ichthyofauna of north-western Poland” i został opublikowany w czasopiśmie *EJPAU* (*Electronic Journal of Polish Agriculture Universities*). Badanie to obejmowało 332 próbki ryb obejmujące 20 gatunków zebranych w sześciu miejscach w Polsce. Miejsca te obejmowały zarówno wody słodkie (5 lokalizacji), jak i brackie (Morze Bałtyckie). Wyniki analiz molekularnych były dodatnie w 17 przypadkach, a nosicielami wirusa były: karaś srebrzysty, *Carassius gibelio* (2 przypadki), okoń, *Perca fluviatilis* (2 przypadki),

sandacz, *Stizostedion lucioperca* (2 przypadki), sterlet *Acipenser ruthenus* (5 przypadków), oraz babka bycza, *Neogobius melanostomus* (6 przypadków).

Choć ogólnie ujęte występowanie wydaje się bardzo niskie, nie należy nie doceniać potencjału epizootycznego wykrytych bezobjawowych nosicieli i ich zdolności do wywoływania bardzo kosztownej śmiertelności poprzez roznoszenie wirusa na wiele węgorzy. Największą liczbę przypadków dodatnich wykryto w przypadku babki byczej, co czyni transmisję pionową wirusa *Herpesvirus anguillae* całkiem prawdopodobną, gdyż ta mała ryba może być łatwym łupem dla węgorzy.

Trzeci artykuł zawarty w niniejszej pracy doktorskiej zatytułowano „Detection of herpesvirus anguillae (AngHV-1) in European eel originating from northern Poland—assessment of suitability of selected diagnostic methods” i opublikowano w *Journal of Fish Diseases*. Głównym celem tego badania była optymalizacja metod diagnostycznych w wykrywaniu wirusa *Herpesvirus anguillae* z użyciem konwencjonalnego PCR, zagnieżdżonego (nested) PCR oraz hybrydyzacji *in situ*. Ponadto hodowano komórki nerek węgorza (EK-1, nr 809) w trzech pasażach po ich zakażeniu filtratami z puli narządów węgorzy. Materiał zbierano z pojedynczego miejsca poboru, a liczba przeanalizowanych węgorzy wyniosła 15. Tkanki skrzeli, skóry, serca, nerek i śledziony przebadano osobno, jak również w ramach puli próbek. Wyniki wykazały, że tylko dla 53,3% poszczególnych próbek narządów uzyskano dodatni wynik na obecność wirusa AngHV-1 metodą PCR, podczas gdy metoda nested PCR wykazała występowanie wirusa na poziomie 93,3%. W hodowlach pasażowanych nie uzyskano widocznego efektu cytopatycznego w pierwszych dwóch cyklach, ale uzyskano go w trzecim cyklu pasażowania. Ten wynik dodatni widoczny był jedynie w przypadku zastosowania metody nested PCR.

Okazało się, że tkankami najbardziej odpowiednimi do wykrywania wirusa AngHV-1 są skóra i skrzela, natomiast pula próbek sporządzona przed izolacją DNA ma bardzo ograniczoną przydatność. Wynik ten może mieć istotne konsekwencje w praktyce, gdyż procedura przesiewowa w poszukiwaniu wirusa u węgorzy nie wymaga zabijania ryb.

W artykule tym omówiono również nowe wytyczne do zarządzania populacjami węgorza w Polsce, będą w zgodzie z bardziej ogólnym zaleceniem Unii Europejskiej. Autorzy wskazali potrzebę wprowadzenia obowiązkowych badań narybku węgorza przeznaczonego do zarybień w celu wykrywania wirusa *Herpesvirus anguillae* (AngHV-1). Zaproponowali też potrzebę zmian na poziomie UE w postaci ograniczenia wolnego, niesprawdzanego obiegu materiału zarybieniowego pomiędzy centrami odchowu.

Pewne aspekty ocenianych publikacji wchodzących w skład niniejszej pracy doktorskiej należy w mojej opinii dopracować lub poprawić.

Artykuł 1

Grup próbek tkanek węgorza nie zidentyfikowano pod względem wielkości ryb. Może to wpływać na porównanie wyników. Wiadomo, że śmiertelność najmniejszych osobników jest zwykle największa. Z drugiej strony grupa największych ryb jest zwykle najmniej zakażona, gdyż te zakażone padły, a te obecne w próbie przeżyły, zwykle bogatsze o nabytą odporność. Przy takim podejściu tracimy jeden z ważnych parametrów w dyskusji — wielkość ryby. Nie udało mi się odnaleźć informacji o tym, czy badane ryby wykazywały oznaki kliniczne, która można by przypisać zakażeniu wirusem AngHV1? Rozdział „Materiały i metody” jest dość chaotyczny i zawiera pojęcia wymagające wyjaśnienia (np. co to są „skrawki skrzeli”). Brakuje informacji (we wszystkich trzech artykułach) o zaleceniach do gospodarowania zasobami węgorza w innych krajach UE. Czy są w takim stopniu liberalne jak w Polsce czy może bardziej restrykcyjne?

Artykuł 2

Stan prawny „zaleceń dotyczących gospodarowania” w Polsce należy dokładniej wyjaśnić. Proszę wyjaśnić, jakie kroki i/lub procedury prawne są potrzebne do zmiany istniejących zaleceń.

Artykuł 3

Wszystkie 15 węgorzy trzymano razem przez trzy dni. Czy to mogło wpłynąć na wyniki? Czy taka kohabitacja mogła zwiększyć odsetek zakażeń?

Rozdziały wstępu (kappa) dobrze streszczają wyniki trzech publikacji. Przekazują także dodatkowe szczegóły pomocne w zrozumieniu istotności tych badań i ocenie ich wartości. Te dodatkowe rozdziały to: „Cel pracy”, „Wnioski” i „Streszczenie”. Cele tej pracy doktorskiej są moim zdaniem dobrze opracowane i wyrażone i jako recenzent mogę uznać, że zostały one w tej pracy w dużym stopniu osiągnięte. Jednak we wnioskach zawarto nie tylko cztery wnioski, ale także dwa zalecenia. Występuje istotny problem z rozdziałem „Streszczenie”. Co zaskakuje, ten czteroakapitowy rozdział zawiera trzy akapity, które są bez znaczenia lub byłyby bardziej na miejscu w części „Dyskusja”. To spowodowałoby jednak dodatkowy problem, gdyż rozdział kappa nie zawiera „Dyskusji”!

Głównym problemem językowym lub edytorskim jest zbyt małe użycie przedimków (the, a). Zauważyłem dziwny cytat z piśmiennictwa „(Med. Weter. 2017, 71(2), pp. 565)”.

Podsumowując, chciałbym zauważyć, że autor poruszył ciekawy problem o ważnych aspektach praktycznych. Badania dobrze zorganizowano i wykonano. Wyniki szybko opublikowano w trzech czasopismach w międzynarodowym obiegu. Poszczególne artykuły wchodzące w skład niniejszej kompilacji zostały ocenione przez recenzentów czasopism, zatem moja opinia odnosi się głównie do ogólnego obrazu tego zestawu trzech artykułów. Pomimo pewnych wspomnianych wcześniej braków moja opinia o tej pracy doktorskiej jest pozytywna. Mam także nadzieję, że pewne wątpliwości wspomniane w mojej recenzji zostaną wyjaśnione podczas publicznej obrony tej pracy.

Niniejszym oświadczam, że w mojej opinii praca doktorska pana Tuana Thuca Nguyena jest zgodna z wymogami Ustawy o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym Rzeczypospolitej Polskiej i w związku z tym uprzejmie proszę Radę Wydziału Nauk o Żywności i Rybactwa o dopuszczenie pana Tuana Thuca Nguyena do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Sporządzono w Szczecinie, dnia 19 listopada 2017 r.

Prof. dr hab. Wojciech Piasecki

UCHWAŁA nr 2/2018
Rady Wydziału Nauk o Żywności i Rybactwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu
Technologicznego w Szczecinie z dnia 24 stycznia 2018 r.

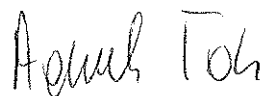
w sprawie nadania stopnia doktora mgr inż. Thuc Tuan Nguyen

Na podstawie art. 14 ust. 2 pkt. 5 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 565, z późn. zm.), Rada Wydziału Nauk o Żywności i Rybactwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie na posiedzeniu w dniu 24 stycznia 2018 roku, nadaje **mgr inż. Thuc Tuan Nguyen** stopień doktora nauk rolniczych w zakresie rybactwa.

§ 1

Uchwała wchodzi w życie z dniem jej podjęcia.

Przewodnicząca Rady Wydziału
Dziekan



Dr hab. inż. Agnieszka Tórz, prof. nadzw.