

Streszczenie

Akwakulturę karpia (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) prowadzi się w Europie głównie w stawach, czyli sztucznych zbiornikach wodnych, wykorzystując zwykle naturalne ukształtowanie terenu sprzyjające ich budowie. U karpia hodowanych w stawach zasilanych wodą z naturalnych cieków oraz gospodarstwach, w których nie prowadzi się tarła na bazie własnych tarlaków, często dochodzi do zawleczenia chorób, w tym patogennych wirusów. Głównymi zagrożeniami dla gospodarki karpiowej jest koi herpes virus (KHV) oraz carp edema virus (CEV).

W niniejszej pracy zostały postawione cele związane ze znacznym poszerzeniem wiedzy z zakresu stopnia zainfekowania wytypowanych gospodarstw karpiowych wirusem CEV, oceny tropizmu, czyli powinowactwa do komórek i tkanek u karpia, oszacowaniu skuteczności metody detekcji pośredniej (nested PCR, real-time PCR, hybrydyzacja *in situ*) oraz analizie pozyskanych sekwencji z wykorzystaniem modelu ewolucji molekularnej.

Analizom poddano łącznie 16 gatunków ryb z 11. lokalizacji, w tym dziewięciu gospodarstw hodowli karpia, wód Zalewu Szczecińskiego i Jeziora Dąbie. Analizom molekularnym poddano łącznie 682 próby.

Wyniki niniejszej pracy wskazują na rozszerzenie spektrum gatunkowego wirusa CEV o gatunek lina (*Tinca tinca* (Linnaeus, 1758)), uklei (*Alburnus alburnus* (Linnaeus, 1758)), płoci (*Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758)) i karasia (*Carassius carassius* (Linnaeus, 1758)), co przy założeniu pospolitego występowania tych gatunków w wodach naturalnych zasilających stawy karpiove stwarza zagrożenie powstawania dodatkowej ścieżki transmisji CEV.

Wykazano również powinowactwo do komórek skóry i nerki, w których określono dodatni tropizm wirusa. Stwarza to nowe możliwości diagnostyczne, które dotychczas zgodnie z wytycznymi Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (WOAH) oparte były tylko o skrawki skrzel.

Na podstawie uliniowania i porównania sekwencji w obrębie genu odpowiedzialnego za syntezę białka 4a określono poziom ich zmienności genetycznej. Wynika z niego, że wirus CEV ulega systematycznym mutacjom a utworzenie dwóch wyodrębnionych kładów w drzewie filogenetycznym potwierdza wyodrębnianie się tzw. „polskich izolatów CEV”.

Na podstawie uzyskanych wyników zostaną przygotowane wytyczne dla Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (WOAH). W procedurach detekcji CEV autorka zasugeruje konieczność wykorzystania skóry i nerki. Ponadto, biorąc pod uwagę klady utworzone w drzewie filogenetycznym sekwencji wirusa CEV, do CEFAS w Wielkiej Brytanii, zostanie przesłana informacja o konieczności projektowania aktualnych starterów do reakcji PCR.

Natalia Adamkowska

Prof. dr hab. inż. Wojciech Piasecki

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Natalii Adamkowskiej

wykonana na zlecenie Dziekana Wydziału Nauk o Żywności i Rybactwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie z dnia 17 maja 2023 roku

Otrzymana do oceny rozprawa doktorska zatytułowana **Detekcja, wektory, elementy biologii carp edema virus (CEV) w aspekcie hodowli karpia w Polsce** jest klasyczną monografią, jednak w tym przypadku poddaną edycji, wydrukowaną i oprawioną. Trudno ocenić jednak czy oceniana monografia ma rangę publikacji (na jaką wygląda) bo zabrakło stopki redakcyjnej z nakładem, nazwą wydawcy, drukarni, nazwiskami redaktora, korektora, składacza, etc.). W związku z powyższym zakładam, że jest to nieopublikowana dysertacja.

Łącznie rozprawa ma 59 numerowanych stron wydrukowanych na obydwu stronach papieru co optycznie zmniejsza jej objętość. Zawiera 23 ryciny, 16 tabel a w spisie literatury autorka przywołuje 82 źródła oraz trzy strony internetowe.

Dysertacja napisana w języku polskim ma tradycyjną strukturę obejmującą wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski oraz literaturę. Wstęp, materiał i metody oraz wyniki, mają liczne, ułożone hierarchicznie, podrozdziały.

Znaczenie akwakultury systematycznie rośnie z roku na rok i jest to związane ze wzrostem ludzkiej populacji i jej zapotrzebowania na żywność w tym również ryby. W Europie środkowej i środkowo-wschodniej oraz w innych miejscach na świecie karp pospolity (*Cyprinus carpio*) był i jest nadal tradycyjnie najpopularniejszym obiektem hodowli śródlądowej. Niestety czynnikiem ograniczającym produkcję karpia są liczne choroby, z których największe znaczenie mają choroby wirusowe. Najważniejsze z nich to spring viremia of carp (SVC), koi herpes virus disease (KHVD), a w ostatnich latach także carp edema virus disease (CEVD). Choroby te mają zasięg globalny a ich przenoszenie zależy od wielu czynników środowiskowych, prawidłowych procedur prewencyjnych a także mechanizmów odpornościowych różnych szczepów genetycznych (linii hodowlanych) samego karpia. Niezwykle ważne są też drogi przenoszenia chorób wirusowych, w tym ich wektory

czyli organizmy żywe zazwyczaj nie wykazujące objawów klinicznych ale mające potencjał przenoszenia chorób między stadami podatnej ryby lub między mniej lub bardziej odległymi akwenami. Nie można też pominąć biologii samego wirusa, jego potencjału infekcyjnego, atakowanych narządów i ich znaczenia w diagnostyce. Te właśnie aspekty postanowiła zbadać Pani mgr Natalia Adamkowska w toku jej badań w ramach projektu doktorskiego.

Autorka pobierała próby w latach 2017 i 2018 w bardzo obszernym zakresie i stanowiło to niewątpliwie duże wyzwanie logistyczne. Uwzględniła dziewięć gospodarstw rybnych oraz dodatkowo wody otwarte Jeziora Dąbie oraz Zalewu Szczecińskiego. Pobierając próby nie ograniczyła się do karpia ale uwzględniła również piętnaście innych gatunków (podgatunków). Były to: płoć (*Rutilus rutilus*), sandacz (*Sander lucioperca*), okoń (*Perca fluviatilis*), babka śniadogłowa (*Neogobius melanostomus*), karaś pospolity (*Carassius carassius*), certa (*Vimba vimba*), rozpiór (*Ballerus ballerus*), stornia (*Platichthys flesus*), tolpyga pstra (*Hypophthalmichthys nobilis*), lin (*Tinca tinca*), sum europejski (*Silurus glanis*), amur (*Ctenopharyngodon idella*), szczupak (*Esox lucius*), ukleja (*Alburnus alburnus*) oraz karp koi (*Cyprinus carpio koi*). Zbadano różne tkanki i narządy u 682 osobników ryb.

Głównym celem pracy było określenie stopnia zainfekowania karpia przez CEV (carp edema virus) w Polsce, przede wszystkim w jej części północno zachodniej, co do tej pory nie było zbadane. Cele szczegółowe były następujące:

- „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 moim przekonaniu, tytuł rozprawy prawidłowo oddaje jej treść. Układ formalny pracy i jej podział na rozdziały i podrozdziały są też prawidłowe. Cele pracy zostały zrealizowane a jej wyniki dostarczają nowych informacji. Ustalono, że wśród potencjalnych wektorów CEV znajdują się gatunki wcześniej nie zgłaszane takie jak lin (*Tinca tinca*), ukleja (*Alburnus alburnus*), płoć (*Rutilus rutilus*) oraz karaś (*Carassius carassius*). Gatunki te występują pospolicie a zatem mogą stanowić dogodne ogniwo w transmisji CEV.

Stwierdzono też powinowactwo wirusa do komórek skóry i nerki, w których określono dodatni tropizm tego patogenu. Dotychczas Światowa Organizacja Zdrowia Zwierząt (WOAH) rekomendowała pobieranie próbek wyłącznie ze skrzelii a zatem ustalenia Pani mgr Natalii Adamkowskiej stwarzają nowe możliwości diagnostyczne dla ichtiopatologów. Ustalono też, na podstawie uliniowania i porównania sekwencji w obrębie genu odpowiedzialnego za syntezę białka 4a, że CEV ulega systematycznym mutacjom. W skonstruowanym drzewie filogenetycznym próbki badane w ramach ocenianego doktoratu były reprezentowane przez wyraźnie wyodrębnione klady nazwane przez autorkę „polskimi izolatami CEV”. Zaobserwowana zmienność genetyczna jest sygnałem dla władz weterynaryjnych, że istnieje pilna potrzeba uaktualniania starterów reakcji PCR (real-time PCR). To odkrycie Pani mgr Natalii Adamkowskiej jest bardzo ważne bowiem brak aktualnych starterów może skutkować fałszywie negatywnymi wynikami badań. Autorka deklaruje przesłanie stosownych informacji na ten temat do CEFAS (Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science) w Wielkiej Brytanii.

Badania Pani mgr Natalii Adamkowskiej dotyczą ważnego tematu, które ma przełożenie ekonomiczne. Potencjalnie CEV może wywołać śnięcie karpia na poziomie nawet 90% obsad (co nie wyklucza sytuacji gdzie wirus jest wykrywany u bezobjawowych ryb tego gatunku). Doktorantka rozpoczęła swoje badania w podobnym czasie jak inni naukowcy z naszego kraju. Niestety pracując jednoosobowo miała mniejsze szanse na upublicznienie swoich wyników w porównaniu z szybkim terminie jak to zrobił wieloosobowy zespół badawczy z Puław (Matras i in. 2017, 2019, 2022). Powyższe porównanie skłania do refleksji nad przyszłością procedur doktorskich. Już teraz widać, że doktorant będący częścią dużego zespołu badawczego i publikujący swoje wyniki etapowo, niezwłocznie jak są gotowe, ma większe szanse na sukces niż samotny doktorant czekający z wynikami całego doktoratu na przedstawienie ich w dysertacji.

Jak przystało na pracę doktorską, rozprawa Pani mgr Natalii Adamkowskiej jest wielowątkowa, porusza aktualne i ważne problemy naukowe, posługuje się najnowszymi metodami badawczymi oraz wnosi nowe aspekty do wiedzy. Martwi mnie jednak skrótowe potraktowanie wstępu a szczególnie analizy literatury naukowej co negatywnie wpływa na objętość tej rozprawy i potencjalnie również na jej jakość. Jednocześnie niektóre zagadnienia są, w moim przekonaniu, zbyt obszernie przedstawione (charakterystyka innych chorób wirusowych).

Mam pewne zastrzeżenia do wykorzystanej literatury. W moim rozumieniu przegląd literatury powinien być kompletny (w miarę możliwości) i wyczerpujący, czego niestety w tej pracy zabrakło. Dotyczy to szczególnie prac doktorskich w formie monografii. Poświęcając kilkanaście minut na poszukiwania internetowe dotyczące hasel „Carp Edema Virus” oraz „Koi Sleepy Disease” otrzymałem listę artykułów z których co najmniej kilka (lata 2020–2022) nie znajdowało się w przeglądzie literatury ocenianej dysertacji. Pomińnięcie tych prac mogło (ale nie musiało) wpłynąć na kształt Wstępu oraz Dyskusji.

Nie zgadzam się z przedstawieniem klasyfikacji taksonomicznej karpia we Wstępie. Otóż „Gromada Pisces” jest taksonem nie używanym od wielu lat, gdyż ryby są grupą parafiletyczną. Z taksonomią związana jest też moja uwaga formalna. W streszczeniu pracy, w pełnych nazwach naukowych autorka wyróżnia kursywą nie tylko binomen ale również nazwisko autora opisu i rok co jest niewłaściwe.

Inne uwagi. Stosownie zamiennie skrótów KSD i CEV może być mylące. Również używana w pracy nazwa „odma karpiowa” może być myląca.

Oceniana rozprawa ma też usterki w sposobie cytowania i przytaczania źródeł bibliograficznych. Pięć z nich, wyszczególnionych w rozdziale Literatura nie zostało zacytowanych w tekście (plus trzy źródła internetowe). I odwrotnie – trzy prace wyszczególnione w tekście nie znalazły się w spisie literatury. Dodatkowo, samo cytowanie źródeł literaturowych zawierało inne drobne usterki.

Mapy, fotografie, schematy i wydruki uliniowania sekwencji (łącznie numerowane jako ryciny) są dobrej jakości i właściwie i wyczerpująco ilustrują ocenianą rozprawę. W znakomitej większości przypadków ryciny te są prawidłowo przytaczane w tekście przed pojawieniem się ilustracji i we właściwej kolejności. Wyjątkiem są rycina 1 oraz rycina 2, które nie zostały przytoczone w tekście. Tabele w sposób przejrzysty pokazują dane szczegółowe. Wszystkie tabele są prawidłowo przytoczone przed ich pojawieniem się w tekście.

Podsumowując chciałbym zwrócić uwagę na oryginalność pracy, jej naukowe oraz praktyczne znaczenie, opanowanie trudnego warsztatu badawczego przez autorkę oraz zwięzłe przedstawienie ciekawych wyników. Mam też nadzieję, że niektóre wątpliwości które przedstawiłem w tej recenzji zostaną wyjaśnione w trakcie publicznej obrony tej rozprawy doktorskiej.

Stwierdzam niniejszym, że oceniana praca doktorska spełnia wymagania określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce i dlatego wnoszę do Rady Wydziału Nauk o Żywności i Rybactwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu

Technologicznego w Szczecinie o dopuszczenie Pani mgr Natalii Adamkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Szczecin, 29.07.2023 r.



Prof. dr hab. inż. Wojciech Piasecki

ZAŁĄCZNIK

Prace nie zacytowane w tekście rozprawy (a wyszczególnione w Literaturze)

- Str. 54. Poz. 33. Hryszko K., Lirski A. (2013);
- Str. 55. Poz. 50. Luu-The V., Paquet N., Calvo E., Cumps J. (2005);
- Str. 56. Poz. 62. Perelberg A., Smirnov M., Hutoran M., Diamant A., Bejerano Y., Kotler M. (2003);
- Str. 56. Poz. 72. Soliman H., Lewisch E., El-Matbouli M. (2019);
- Str. 56. Poz. 75. Tyburski J., Studzińska A., Daca P., Tretyn A. (2008);
- Str. 56. Źródła internetowe – nie wiadomo czy i gdzie są cytowane.

Prace nie uwzględnione w Literaturze (a zacytowane w tekście)

- Str. 16. Bauer i Faktorowicz (1969);
- Str. 16. Maj-Paluch i in., 2019);
- Str. 47. Murakami i in., 1976.

Inne drobne uwagi formalne dotyczące literatury

- Str. 13. „Lirski, 2008” – brakuje „i Myszkowski”;
- Str. 16, 18. „Antychowicz, 2014” – są dwie takie prace i zabrakło ich rozróżnienia (a i b);
- Str. 16. „Haenen, 2004” – brakuje „i in.”;
- Str. 16. „Hedrick, 2000” – brakuje „i in.”;
- Str. 18. „Adamek, 2018” – brakuje „i in.”;
- Str. 18. „Jeffery, 2007” – brakuje „i in.”;
- Str. 19. „Lewish, 2015” – powinno być „Lewisch, 2015”;
- Str. 19. „Matrasa i in.” – nie podano roku publikacji;
- Str. 47, 49. „Adamek i in., 2017” – są dwie takie prace i zabrakło ich rozróżnienia (a i b);
- Str. 49. „Adamek (2016)” – brakuje „i in.”;

Str. 56. Poz. 65. Radosavljević V., Maksimović-Zorić Jelena, Veljović Ljubiša, Ljubojević Dragana, Ćirković Miroslav, Marković Zoran, Milićević Vesna. (2017). – imiona większości autorów nie zostały skrócone;

Str. 57. Poz. 81. „Wojda Ryszard. (2004).” – imię nie skrócone.



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, umożliwiający 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 obiektów 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 użytkowe 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.

Dość fajny raport

UCHWAŁA NR 2
Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie
z dnia 19 stycznia 2024 r.

w sprawie nadania stopnia doktora nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo
mgr Natalii Adamkowskiej

Na podstawie art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1669 z późn. zm.) oraz § 1 ust. 1 pkt 2) uchwały nr 130 Senatu Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie z dnia 29 maja 2023 r. w związku z § 96 ust. 8 Statutu Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo uchwala co następuje:

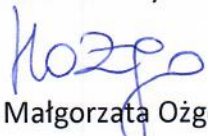
§1

Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie po zapoznaniu się z przebiegiem przewodu doktorskiego postanawia nadać stopień doktora nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo mgr Natalii Adamkowskiej.

§2

Uchwała wchodzi w życie z dniem podjęcia.

Przewodnicząca Rady Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo


dr hab. inż. Małgorzata Ożgo, prof. ZUT

Szczecin, dnia 19 stycznia 2024 r.