Dr hab. Leszek Guz, prof. uczelni
Zakład Chorób Ryb i Biologii
Instytut Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet przyrodniczy w Lublinie

Lublin, 26 sierpnia 2020 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani lek. wet. Joanny Pajdak-Czaus

pt. „Wpływ wirusa zakaźnej martwicy trzustki na zakażenie *Yersinia ruckeri* u pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*)"

wykonanej w Katedrze Epizootiologii, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Aleksandry Platt-Samoraj i promotora pomocniczego dr. n. wet. Elżbiety Terech-Majewskiej.

Recenzję opracowano na zlecenie Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie (pismo nr WMW-DZ.6312.33.2020 z dnia 30.06.2020 r.). Recenzja ma na celu ustalenie, czy rozprawa doktorska Pani lek. wet. Joanny Pajdak-Czaus spełnia wymogi określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr. 65 poz. 595) z późniejszymi zmianami w brzmieniu z dnia 15 września 2017 r. (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789), zgodnie z Art. 175. 1. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1669).

Prezentowana praca przedstawia wyniki badań mających na celu ocenę występowania bakterii *Yersinia ruckeri* oraz wirusa zakaźnej martwicy trzustki (IPNV) w gospodarstwach pstrągowych na terenie polski północno-wschodniej. Oceniono również wpływ zakażenia IPNV na zakażenie bakteriami *Y. ruckeri* u pstrąga tęczowego. W wielu publikacjach opisywane są najczęściej zakażenia ryb jednym drobnoustrojem. W warunkach naturalnych często występują zakażenia mieszane, które są mało poznane i opisane. W obliczu problemu nakreślonego przez Doktorantkę, podjęty temat badań jest ważny i aktualny.

Badania były współfinansowane z projektu Narodowego Centrum Nauki, Preludium 13 (nr 2017/25/N/NZ9/00087), pt. „Badanie mechanizmów oddziaływania wirusa IPN na przebieg jersiniozy u pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*)".

Przedstawiona do oceny praca doktorska lek. wet. Joanny Pajdak-Czaus została napisana w języku polskim i ma typowy dla większości prac eksperymentalnych układ. Całość obejmuje 103 strony, na których zamieszczono: Wstęp (poprzedzony Spisem Treści, Wykazem Skrótów i streszczeniami w języku polskim i angielskim), Uzasadnienie i Cel Pracy, Materiał i Metody, Wyniki, Dyskusję, Wnioski, Streszczenie, Finansowanie Badań i Piśmiennictwo. W pracy uwzględniono 122 pozycje literaturowe, 8 tabel i 23 ryciny.

We wstępie Doktorantka wyczerpująco przedstawiła występowanie pstrąga tęczowego na świecie i w Polsce oraz jego biologię, w aspekcie ograniczeń rozwoju produkcji wynikających z wysokich wymagań środowiskowych i występowania chorób zakaźnych i pasożytniczych. Wymieniła najważniejsze choroby wirusowe i bakteryjne pstrąga tęczowego oraz przedstawiła sytuację epizootyczną w gospodarstwach pstrągowych na terenie Polski, z której wynika, że u pstrągów tęczowych stosunkowo często występują: zakaźna martwica trzustki i jersinioza. Skłoniło to Doktorantkę do zdecydowania się na podjęcie w ramach rozprawy doktorskiej badań dotyczących tych chorób.

Ponadto, szczegółowo opisała zakaźną martwicę trzustki i jersiniozę pstrągów, przedstawiając charakterystykę patogenów, ich patogenność, charakterystykę chorób i metody diagnostyczne. Opisała również układ immunologiczny ryb, zarówno odporność nieswoistą (opisując komórki cytotoksyczne, komórki fagocytarne, układ dopełniacza, interferon, interleukiny, inhibitory proteaz, lizozym, przeciwciała naturalne, pentraksyny, transferynę, ceruloplazminę) oraz odporność swoistą (opisując przeciwciała występujące u ryb i limfocyty T). Ponadto, zwróciła uwagę na wpływ środowiska na układ immunologiczny ryb.

Treść i sposób opracowania tej części pracy doktorskiej, świadczą o bardzo dobrej znajomości przez Doktorantkę zagadnień odnoszących się do obszaru rozprawy. Pozwoliło to na sformułowanie głównego celu badań jakim było określenie relacji w zakażeniu mieszanym wywołanym przez IPNV i *Y. ruckeri*. Doktorantka określiła również szczegółowe cele badań, jakimi były 1) izolacja szczepów *Y. ruckeri* oraz IPNV w gospodarstwach rybackich na terenie Polski północno-wschodniej, 2) charakterystyka pozyskanych izolatów *Y. ruckeri*, 3) ocena obrazu klinicznego choroby po eksperymentalnym zakażeniu pstrąga tęczowego bakteriami *Y. ruckeri* i wirusem IPN oraz po zakażeniu mieszanym (*Y. ruckeri* + IPNV), 4) ocena wybranych parametrów immunologicznych w przebiegu zakażenia *Y. ruckeri*, IPNV oraz w zakażeniach mieszanych, 5) próba określenia relacji pomiędzy IPNV a *Y. ruckeri* w zakażeniu mieszanym.

Rozdział Materiał i Metody został przygotowany prawidłowo. Doktorantka wyczerpująco opisała pozyskiwanie i charakterystykę izolatów (IPNV i *Y. ruckeri*), stosowane techniki badawcze tj. PCR, sekwencjonowanie oraz testy immunologiczne (poziom gamma-globulin, aktywność lizozymu, aktywność ceruloplazminy, aktywność proliferacyjna limfocytów, aktywność metaboliczna i bójcza fagocytów).

Na przeprowadzone badania uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Olsztynie Nr 45/2016 oraz Nr 40/2019.

Wyniki badań zostały przedstawione w sposób klarowny i syntetyczny. Na podkreślenie zasługują bardzo starannie opracowane i wyczerpująco opisane ryciny i tabele. Doktorantka potwierdziła obecność bakterii *Y. ruckeri* w trzech z siedmiu przebadanych gospodarstw pstrągowych. W jednym z nich wyizolowała również IPNV. Wykazała wysoką homologię uzyskanych szczepów *Y. ruckeri*.

W pierwszym eksperymencie zakażano ryby bakteriami *Y. ruckeri* (grupa 1), wirusem IPN (grupa 2) oraz bakteriami *Y. ruckeri* i IPNV (grupa 3) w tym samym czasie. Śnięcia ryb obserwowano głównie u ryb grupy 1 - zakażonych bakteriami *Y. ruckeri* i u ryb grupy 3 - zakażonych *Y. ruckeri* i IPNV. W grupie ryb zakażonych tylko IPNV usnęła tylko jedna ryba. Poziom białka całkowitego mieścił się w granicach wartości przyjętych za referencyjne. Stwierdzono 1) istotne obniżenie poziomu białka całkowitego w grupie ryb zakażonych *Y. ruckeri* - w 72 h.p.z. oraz grupie ryb zakażonych *Y. ruckeri* i IPNV - od 72 h.p.z do końca doświadczenia, 2) istotnie wyższy poziom gammaglobulin u ryb zakażonych

IPNV – w 72 h.p.z. oraz u ryb zakażonych bakteriami – od 14 d.p.z. do końca eksperymentu, 3) istotnie niższy poziom gammaglobulin u ryb zakażonych IPNV oraz u ryb zakażonych IPNV+Yer – w 14 d.p.z., 4)

W drugim eksperymencie najpierw zakażano ryby grupy 2 oraz 3 wirusem IPN (ryby grupy 0 i 1 otrzymały iniekcję czystego podłoża transportowego). Po 2 tygodniach grupa 1 i 3 zostały zakażone *Y. ruckeri* (grupy 0 i 2 otrzymały iniekcję PBS).

Poziom białka całkowitego mieścił się w granicach wartości przyjętych za referencyjne. Odnotowano 1) istotne obniżenie poziomu białka całkowitego w grupach ryb zakażonych *Y. ruckeri* - w 7 d.p.z., 2) istotnie niższy poziom gammaglobulin w grupach zakażonych wcześniej IPNV, ponadto w 7 d.p.z. istotnie wyższy poziom w grupie zakażonej *Y. ruckeri* oraz Yer+IPN, a w 14 d.p.z. w grupie zakażonej *Y. ruckeri*, 3) tendencję wzrostową w aktywności ceruoplazminy – we wszystkich grupach badawczych, oraz istotnie wyższy poziom aktywności ceruloplazminy w grupie Yer+IPN oraz grupie IPNV – w 14 d.p.z., 4) istotnie wyższą aktywność metaboliczną i bójczą fagocytów w grupie Yer-IPN (w porównaniu do innych grup) – od 14 do 14 d.p.z.

Podsumowując rozdział Wyniki, Autorka wykazała umiejętność poprawnego i przekonywującego przedstawienia uzyskanych przez siebie wyników. Zrobiła to w sposób zwięzły, jasny dla czytelnika oraz bardzo poprawny redakcyjnie. Przedstawione wyniki są nowymi danymi wnoszącymi znaczący wkład do aktualnego stanu wiedzy na temat zakażeń IPNV i *Y. ruckeri*.

Uzyskane wyniki podsumowała i omówiła rzeczowo w rozdziale **Dyskusja**, odnosząc je do dostępnych w literaturze danych. Uzyskane wyniki badań zostały podsumowane w postaci siedmiu prawidłowo sformułowanych wniosków, które niosą praktyczne przesłanki wynikające z wyników.

Przedstawiona bibliografia stanowi bardzo dobry przegląd aktualnej literatury.

Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na nieścisłości dostrzeżone w pracy.

- w celu pracy Doktorantka napisała, że izolowała i charakteryzowała szczepy *Y. ruckeri* oraz IPNV, natomiast należałoby napisać, że izolowano i charakteryzowano uzyskane izolaty,

- w rozdziale 3.2.2. Doktorantka napisała „Grupy 0 i 1 otrzymały iniekcję jałowego PBS” a z analizowanego tekstu wynika, że powinno być: „Grupy 0 i 2 otrzymały iniekcję jałowego PBS”,

- na stronie 84, po „Alun i wsp.” brakuje daty publikacji,

- w rozdziale Piśmiennictwo, publikacje Bengten i wsp., Bruno i wsp., Dopazo i wsp., FEAP, Fernandez i wsp., Johansen i wsp., Lewandowska i wsp, Magnadottir i wsp., McCarthy i wsp., Pajdak i wsp., Romalde i wsp., Siwicki i wsp. - powinny być uszeregowane w tej samej konwencji jak wcześniej uszeregowano prace Austin i wsp.,

- w rozdziale Piśmiennictwo na stronie 101, jest napisane: „The Journal of experimental medicine”, a powinno być: The Journal of Experimental Medicine,

- w rozdziale Piśmiennictwo na stronie 102, jest napisane: „molecular biology and Evolution”, a powinno być: Molecular Biology and Evolution,

- w rozdziale Piśmiennictwo na stronie 102, w tytule pracy Tordensky Frantzen i wsp. (2020) jest napisane: „Species belonging to the Serratia …” a powinno być: Species belonging to the *Serratia*,

- w rozdziale Piśmiennictwo na stronie 102, w tytule pracy Willumsen (1989) jest napisane: „Yersinia *ruckeri*” a powinno być: *Yersinia ruckeri*.

Przedstawiona do oceny praca doktorska lek. wet. Joanny Pajdak-Czaus, pomimo wyeksponowanych drobnych uwag krytycznych, stanowi opracowanie oryginalne, prezentujące wyniki badań uzyskane poprzez samodzielne wykonanie bardzo dobrze zaplanowanego doświadczenia.

Ponadto, Doktorantka jest współautorką 4 publikacji w wysoko punktowanych czasopismach (w 2 pracach jest pierwszym autorem).

Podsumowanie

Rozprawa doktorska Pani lek. wet. Joanny Pajdak-Czaus jest wartościowym i oryginalnym dorobkiem Doktorantki. W mojej opinii Pani lek. wet. Joanna Pajdak-Czaus osiągnęła zamierzone cele, co wskazuje, że jest w pełni przygotowana do samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

Recenzowana praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim w świetle przepisów z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr. 65 poz. 595) z późniejszymi zmianami w brzmieniu z dnia 15 września 2017 r. (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789), zgodnie z Art. 175. 1. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1669). Z pełnym przekonaniem wnioskuję o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani lek. wet. Joanny Pajdak-Czaus do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę nakład pracy włożony w wykonanie badań oraz wartość merytoryczną uzyskanych wyników wnoszę o przyznanie Pani lek. wet. Joannie Pajdak-Czaus stosownej nagrody.

Lublin, 28 lipca 2020 r. Dr hab. Leszek Guz