



# **AUTOREFERAT**

---

Agnieszka Joanna Pękala-Safińska  
Zakład Chorób Ryb  
Państwowy Instytut Weterynaryjny-Państwowy Instytut Badawczy  
w Puławach

Puławy, 2018

## 1. Imię i Nazwisko

Agnieszka Joanna Pękala-Safińska

## 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

- 2009 - **doktor nauk weterynaryjnych**, Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy (PIWet-PIB) w Puławach. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Charakterystyka fenotypowa i genotypowa krajowych izolatów *Yersinia ruckeri* w aspekcie ich patogenności dla ryb”.
- 2006- **specjalista w dziedzinie choroby ryb**, studia podyplomowe dla lekarzy weterynarii, Specjalizacja nr 8 Choroby Ryb, Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy (PIWet-PIB) w Puławach (2004-2006). Dyplom nr 8/22/2007 nadany przez Komisję do Spraw Specjalizacji Lekarzy Weterynarii decyzją z dn. 30.06.2007.
- 2001 - **lekarz weterynarii**, Wydział Medycyny Weterynaryjnej Akademi Rolniczej (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy) w Lublinie, 2000.

## 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

- od 2009 r. – **adiunkt** - Zakład Chorób Ryb, Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy w Puławach.
- 2006 - 2009 r. – **asystent** - Zakład Chorób Ryb, Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy w Puławach.
- 2000 r. - **specjalista inżynierjno-techniczny** - Zakład Chorób Ryb, Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy w Puławach.

## 4. Wskazanie osiągnięcia\* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.)

### 4a) Tytuł osiągnięcia naukowego

Infekcje bakteryjne ryb słodkowodnych – nowe zagrożenia

### 4b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

#### Praca przeglądowa stanowiąca wstęp:

**H-1: Pękala-Safińska A.** (2018) Contemporary threats of bacterial infections in freshwater fish. *Journal of Veterinary Research*, 62, 261 - 267, doi: 10.2478/jvetres-2018-0037.

IF<sub>2017</sub> = 0,811; MNI<sub>SW</sub><sub>2017</sub> = 15 pkt.; liczba cytowań (WoS Core Collection) – 0

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji artykułu, przeglądzie literatury oraz przygotowaniu pracy do druku. Mój udział procentowy szacuję na 100%.*

## Prace oryginalne:

**H-2:** Kozińska A., Pękala A. (2012) Characteristics of disease spectrum in relation to species, serogroups, and adhesion ability of motile Aeromonads in fish. *The ScientificWorld Journal*, Volume 2012, Article ID 949358, 9 pages doi:10.1100/2012/949358.

IF<sub>2012</sub> = 1,73; MNiSW<sub>2012</sub> = 35 pkt.; liczba cytowań (WoS Core Collection) – 8

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: udziale w opracowaniu koncepcji artykułu, wykonaniu badań laboratoryjnych, a następnie opracowaniu ich wyników, jak również przygotowaniu pracy do druku. Mój udział procentowy szacuję na 65%.*

**H-3:** Kozińska A., Paździor E., Pękala A., Niemczuk W. (2014) *Acinetobacter johnsonii* and *Acinetobacter lwoffii* - the emerging fish pathogens. *Bulletin of Veterinary Institute in Pulawy*, 58, 193 - 199, doi: 10.2478/bvip-2014-0029.

IF<sub>2014</sub> = 0,357; MNiSW<sub>2014</sub> = 15 pkt.; liczba cytowań (WoS Core Collection) – 12

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: udziale w opracowaniu koncepcji artykułu, wykonaniu badań laboratoryjnych i udziale w opracowaniu ich wyników oraz przygotowaniu pracy do druku. Mój udział procentowy szacuję na 50%.*

**H-4:** Pękala A., Kozińska A., Paździor E., Głowacka H. (2015) Phenotypical and genotypical characterization of *Shewanella putrefaciens* strains isolated from diseased freshwater fish. *Journal of Fish Diseases*, 38, 283 - 293, doi: 10.1111/jfd.12231.

IF<sub>2015</sub> = 2,053; MNiSW<sub>2015</sub> = 35 pkt.; liczba cytowań (WoS Core Collection) – 12

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji artykułu, wykonaniu części badań laboratoryjnych, opracowaniu wyników i przygotowaniu pracy do druku. Mój udział procentowy szacuję na 80%.*

**H-5:** Pękala A., Paździor E., Antychowicz J., Bernad A., Głowacka H., Więcek B., Niemczuk W. (2018) *Kocuria rhizophila* and *Micrococcus luteus* as emerging opportunist pathogens in brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). *Aquaculture*, 486, 285 - 289, doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.12.028.

IF<sub>2017</sub> = 2,570; MNiSW<sub>2017</sub> = 35 pkt.; liczba cytowań (WoS Core Collection) – 0

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji artykułu, wykonaniu części badań laboratoryjnych, opracowaniu wyników i przygotowaniu pracy do druku. Mój udział procentowy szacuję na 85%.*

## Sumaryczna punktacja 5 publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe:

- współczynnik wpływu (Impact Factor, IF)<sup>1</sup>: **7,521**
- liczba punktów wg Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW)<sup>2</sup>: **135**
- liczba cytowań<sup>3</sup>: **32**

<sup>1</sup>Wg listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania

<sup>2</sup>Wg komunikatów MNiSW, zgodnie z rokiem opublikowania

<sup>3</sup>Wg bazy Web of Science (WoS), z dnia 22. 10. 2018.

#### **4c) omówienie celu naukowego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

##### **Wstęp**

Środowisko wodne oraz zamieszkujące w nim organizmy nieustannie wpływają na siebie, powodując różnicowanie już istniejących w danym ekosystemie form życia. Procesy te zachodzą zarówno u organizmów wyższych, w tym ryb, jak również wśród bakterii, z których większość jest saprofitami zasiedlającymi osady denne, rośliny, fito- i zooplankton, czerpiąc energię potrzebną do życia z martwych szczątków organicznych. Niektóre bakterie kolonizują powłoki skórne, skrzela czy przewód pokarmowy ryb, żyjąc tam jako organizmy komensalne, wywierając korzystny wpływ na układ odpornościowy tych zwierząt. Jeszcze inne stanowią zagrożenie dla zdrowia ryb, będąc tym samym określane jako organizmy warunkowo chorobotwórcze (Jara i Chodyniecki, 1999).

Rozwój hodowli ryb i jej intensyfikacja, jak również wprowadzanie do hodowli nowych gatunków lub też linii genetycznych danych gatunków ryb, może powodować pojawianie się nowych jednostek chorobowych. Zaburzeniu ulega bowiem swoista równowaga biologiczna panująca pomiędzy gospodarzem i mikroorganizmem. W procesie tym nie bez znaczenia są zmiany zachodzące w środowisku wodnym spowodowane przez czynniki klimatyczne, do których należą obserwowane przez ostatnie lata co raz cieplejsze zimy, wyższe temperatury w lecie, obniżanie się poziomów wód gruntowych, a co za tym idzie ich deficyt. Bardzo duże znaczenie mają także wszelkie zabiegi hodowlane, profilaktyczne czy lecznicze związane z produkcją ryb. Oprócz ich niewątpliwych zalet i korzyści, zabiegi te mogą niekorzystnie zmienić jakość środowiska, wywołując zachwianie homeostazy, zmieniając parametry mikrobiologiczno-fizyko-chemiczne wody. Procesy te przyczyniają się niewątpliwie do uruchamiania zjawisk adaptacyjnych lub eliminacyjnych wśród mikroorganizmów, czego efektem jest diagnozowanie nowych infekcji bakteryjnych u ryb. Zagadnienia dotyczące bakteryjnych czynników chorobowych ryb są tematem wielu badań prowadzonych na całym świecie. Duże zainteresowanie tą problematyką świadczy o istotnej ich roli w patologii chorób tych zwierząt.

Występowanie poszczególnych jednostek chorobowych u ryb uzależnione jest w dużej mierze od warunków klimatycznych panujących w danej strefie czy regionie. Oznacza to, że inne problemy zdrowotne spotykane są u ryb hodowanych w basenie Morza Śródziemnego, a inne w państwach Europy północnej. W centralnej części Europy, wśród chorób o etiologii bakteryjnej u karpia (*Cyprinus carpio* L.) i pstrągów tęczowych (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) wciąż najczęściej spotykane są infekcje powodowane przez bakterie *Aeromonas*. Wywołują one głównie trzy jednostki chorobowe o nazwach MAS (z ang. motile aeromonas septicaemia), która określana jest jako posocznica krwotoczna, MAI (z ang. motile aeromonas infection) określana jako postać skórna oraz wrzodzienica (Christofilogiannis, 2013; Olsen i Ojala, 2014; Olesen i Vendramin, 2016; Olesen N. J. i wsp., 2018).

W polskich hodowlach ryb dominują infekcje warunkowo chorobotwórczych Gram ujemnych bakterii, na czele których wymienić należy powszechnie znane *Aeromonas* spp., jak

również częste zakażenia wywołane przez *Pseudomonas* spp. oraz *Flavobacterium* spp. Niemniej jednak w ostatnich latach, w patologii bakteryjnych chorób ryb słodkowodnych nie tylko w Polsce, obserwuje się dynamiczne zmiany. Od ryb wykazujących objawy kliniczne i/lub śnięcia izolowane są bardzo często bakterie nie łączone wcześniej z patologią ryb. Do grupy tej należą Gram ujemne drobnoustroje, takie jak: *Acinetobacter* spp., *Plesiomonas shigelloides*, *Shewanella putrefaciens*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*. Ponadto, często identyfikowane są Gram dodatnie bakterie: *Lactococcus* spp. oraz *Streptococcus* spp., a ostatnio *Kocuria* sp. oraz *Micrococcus* sp.

Zarówno rozwój technik i metod diagnostycznych, zmiany klimatyczne, jak i obrót materiałem zarybieniowym, wpłynęły zapewne na zmiany w składzie jakościowym i ilościowym mikroflory izolowanej od ryb. O ile bakterie takie jak *Aeromonas* spp. związane są od lat z zaburzeniami zdrowotnymi obserwowanymi u ryb, o tyle *Shewanella putrefaciens* stosunkowo od niedawna stanowi poważne zagrożenie dla hodowli tych zwierząt. W swojej praktyce zawodowej co raz częściej izoluję *Acinetobacter* spp., a od pewnego czasu uwagę zwróciłam na bakterie z rodziny *Micrococcaceae*, tj. na *Kocuria rhizophila* oraz *Micrococcus luteus*. Wpływ tych drobnoustrojów na stan zdrowia ryb nie do końca jest jasny i zbadany. Szczegółowe informacje dotyczące aktualnej sytuacji epizootycznej w odniesieniu do infekcji bakteryjnych diagnozowanych u ryb w Polsce i na świecie w ostatnich latach zebrałam w pracy przeglądowej [H1] [Pękala-Safińska A.: *Contemporary threats of bacterial infections in freshwater fish. J Vet Res, 62, 261 - 267*].

### **Cel podjętych badań**

Celem podjętych badań była analiza przyczyn i obrazu klinicznego zaburzeń zdrowotnych diagnozowanych u ryb hodowlanych w Polsce, w aspekcie charakterystyki drobnoustrojów je wywołujących. Powyższe zagadnienia zostały przedstawione w prezentowanym jednotematycznym cyklu publikacji, które dotyczyły:

- określenia wpływu różnych gatunków bakterii *Aeromonas* na obraz kliniczny zaburzeń zdrowotnych obserwowany u ryb, biorąc pod uwagę wybrane właściwości tych bakterii,
- charakterystyki nowych gatunków bakterii izolowanych od ryb,
- określenia potencjału chorobotwórczego nowo izolowanych bakterii pod kątem zagrożeń dla stanu zdrowia ryb.

### **Określenie wpływu różnych gatunków bakterii *Aeromonas* na obraz kliniczny zaburzeń zdrowotnych obserwowany u ryb, biorąc pod uwagę wybrane właściwości tych bakterii.**

Bakterie należące do rodziny *Aeromonadaceae* mogą wywoływać niekorzystny wpływ na stan zdrowotny ryb. Od wielu lat uważano, że obserwowane objawy chorobowe oraz śnięcia najczęściej wywoływane są przez *A. hydrophila*, *A. caviae* i *A. sobria*. Chociaż mikroorganizmy te są już dobrze znane i scharakteryzowane, wciąż pojawiają się nowe doniesienia wskazujące na ich różnorodność, która bezpośrednio wpływa na obraz kliniczny infekcji. Już sama klasyfikacja tych drobnoustrojów nastręcza wiele trudności. W obrębie rodzaju *Aeromonas* wyróżnia się bowiem 17 genotypów i 14 fenotypów (Carnahan i Joseph,

2005), a kolejnych siedem gatunków zostało włączonych do rodzaju *Aeromonas* (Janda i Abbott, 2010). Większość z nich to ruchliwe i mezofilne bakterie, powszechnie występujące w ekosystemach wodnych (Noterdaeme i wsp., 1991; Monford i Baleux, 1990). Jedyne psychrofilny gatunek nie wykazujący zdolności ruchu to *Aeromonas salmonicida*. Niemniej i w tym przypadku diagnozowane są również ruchliwe izolaty, określane jako *A. hydrophila*-like (Carnahan i Joseph, 2005).

Ruchome i mezofilne *Aeromonas* spp. są dobrze znane jako oportunistyczne, ale ważne czynniki chorobotwórcze ryb oraz innych organizmów wyższych, w tym ludzi (Janda i Abbott, 2010). Za infekcje u różnych gatunków ryb odpowiedzialne są takie mikroorganizmy jak *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii* bt. *sobria*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas jandaei*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas bestiarum* oraz mezofilne szczepy *A. salmonicida* (Esteve i wsp., 1995; Wahli i wsp., 2005; Kozińska, 2007; Austin i Austin, 2007). Obrazy kliniczne infekcji wywołanych przez wyżej wymienione drobnoustroje różnią się znacznie pod względem obserwowanych objawów. Mogą one dotyczyć tylko zmian skórnych lub/i narządów wewnętrznych, czasami będą zlokalizowane miejscowo, innym razem są rozległe, powodując ogólnoustrojową infekcję (Esteve i wsp., 1995; Ogara i wsp., 1998; Majumdar i wsp., 2006). Zmienne objawy kliniczne, jak też różnorodność serologiczna ruchliwych *Aeromonas* sugeruje związek pomiędzy określonymi symptomami choroby, a obecnie uznanymi gatunkami i / lub serogrupami tych bakterii.

Wśród gatunków *Aeromonas* spp. występuje duże zróżnicowanie serologiczne, obejmując 96 ustalonych lub prowizorycznych O-serogrup (Sakazaki i Shimada, 1984). Jednak tylko niektóre z nich, takie jak O3, O6, O11, O14, O16, O18, O21 O29 O33 i O41 wydają się być związane z właściwościami chorobotwórczymi dla określonych gatunków ryb (Santos i wsp., 1996; Esteve i wsp., 2004; Kozińska i Pękala, 2010). W dostępnej literaturze istnieje niewiele danych dotyczących związku poszczególnych gatunków *Aeromonas* i/lub serogrup ze spektrum choroby obserwowanym u różnych gatunków ryb (Esteve i wsp., 1995; Santos i wsp., 1996; Rahman i wsp., 2002). Dlatego też celem naszych badań opisanych w artykule [H2] [*Kozińska i Pękala: Characteristics of disease spectrum in relation to species, serogroups, and adhesion ability of motile Aeromonads in fish. The ScientificWorld Journal, 2012, Volume 2012, Article ID 949358, 9 pages doi:10.1100/2012/949358*] była próba określenia związku pomiędzy poszczególnymi gatunkami *Aeromonas* i serogrupami tych bakterii, które dominują wśród ryb w polskich gospodarstwach rybackich, a objawami chorobowymi obserwowanymi u karpia (*Cyprinus carpio* L.) i pstrągów tęczowych (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Ponadto, przeprowadziłam badania nad zdolnością adhezji wybranych gatunków bakterii *Aeromonas* do skóry, narządów wewnętrznych i komórek krwi karpia i pstrąga, celem określenia znaczenia tej właściwości w rozwoju choroby.

Do przeprowadzenia badań eksperymentalnych na zdrowych karpkach i pstrągach użyłam wybranych bakterii *Aeromonas*, reprezentujących gatunki *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida* (szczepy mezofilne), *A. sobria*, *A. veronii* bt. *sobria*, należących do serogrup O3, O6, O11, O16, O18, O21, O29, O33, O41, a także O (PGO). Selekcji izolatów bakteryjnych dokonałam na podstawie ich identyfikacji do poziomu gatunku oraz grupy serologicznej. Ryby podzieliłam na grupy eksperymentalne, a następnie zakażałam je

podskórnice (Sc) i dootrzewnowo (Ip). Objawy kliniczne rejestrowałam codziennie przez dwa tygodnie.

Podskórna (Sc) iniekcja różnych zawiesin bakterii u karpia, nie wykazała związku pomiędzy gatunkami *Aeromonas* spp. lub serogrupą, a ich zdolnością do wywołania zmian na powłokach ciała. Wszystkie izolaty, oprócz jednego, *A. veronii* bt. *sobria* (serogrupa O41), powodowały powstanie intensywnych owrzodzeń skóry, penetrujących do mięśni szkieletowych. Izolaty *A. veronii* bt. *sobria* należące do serogrup O6 i O11 powodowały szczególnie rozległe zmiany skórne oraz objawy posocznicy. Owrzodzenia skóry u pstrągów spowodowane były tylko przez izolaty należące do niektórych gatunków *Aeromonas* i / lub serogrup, takich jak *A. hydrophila* i *A. veronii* bt. *sobria*, z wyjątkiem jednego należącego do serogrupy O41, a także *A. bestiarum* (O16 i PGO) oraz *A. salmonicida* (O3). Iniekcje dootrzewnowe (Ip) *A. hydrophila* u karpia, jak i pstrągów powodowały posocnicę u tych gatunków ryb. Obserwowaliśmy rozległe zmiany i owrzodzenia skóry, obrzęk odbytu, obrzęk jamy brzusznej, obecność płynu wysiękowego w jamie otrzewnej, anemizację lub przekrwienie narządów wewnętrznych, zwiększoną wilgotność nerki oraz galaretowatą treść w jelitach. Podobne objawy obserwowane były u karpia zakażonych wszystkimi izolatami *A. veronii* bt. *sobria* i *A. salmonicida* należącymi do serotypu O3. W przypadku pstrągów były to *A. sobria* i *A. salmonicida*. Przebieg choroby przyjmował postać ostrą, a śmiertelność ryb wśród zakażonych grup eksperymentalnych wynosiła 60% - 100%. Bakterie *Aeromonas* należące do pozostałych gatunków i grup serologicznych, po iniekcji Ip powodowały stosunkowo łagodne objawy chorobowe, takie jak anemia, wybroczyny w narządach wewnętrznych, lub też nie wywoływały żadnych objawów choroby.

Przeprowadzone badania eksperymentalne wykazały, że obecność zmian w narządach wewnętrznych u karpia i pstrągów, połączona lub nie z posocnicą, zależała istotnie od taksonomicznej przynależności izolatów. Zaobserwowano jednocześnie, że specyficzne obraz choroby wywołany przez izolaty należące do wszystkich gatunków z wyjątkiem *A. hydrophila*, różniły się także w zależności od gatunku ryby. Wszystkie izolaty *A. veronii* bt. *sobria* powodowały posocnicę, ale tylko u karpia. U pstrągów natomiast podobne objawy obserwowano po zakażeniu ryb izolatami *A. salmonicida*, a także *A. sobria*. Żaden izolat *A. bestiarum* nie był w stanie wywołać objawów posocznicy, natomiast wszystkie powodowały stosunkowo łagodne zmiany w narządach wewnętrznych pstrąga. Tylko niektóre bakterie przynależne do serotypów O3 i O11 powodowały podobne zmiany u karpia, a inne należące do serotypów O16 i PGO owrzodzenia skóry u pstrągów. Wykazaliśmy słabą korelację pomiędzy serogrupami bakterii *Aeromonas*, a obrazem choroby, co zostało potwierdzone w odniesieniu do bakterii należących do gatunków *A. bestiarum*, *A. salmonicida* i *A. veronii* bt. *sobria*. Udowodniliśmy natomiast ponad wszelką wątpliwość, że wszystkie szczepy *A. hydrophila*, niezależnie od grupy serologicznej, były w stanie wywoływać owrzodzenie skóry oraz posocnicę, zarówno u karpia, jak i pstrągów.

W rozwoju choroby bardzo duże znaczenie mają liczne czynniki związane ze zjadliwością bakterii. Wśród nich ważne miejsce zajmują właściwości adhezyjne. Parametr ten badałam w odniesieniu do zdolności przylegania wybranych izolatów *Aeromonas* do skóry, narządów wewnętrznych oraz krwinek karpia i pstrągów. W tym celu wykorzystywałam bakterie *Aeromonas* powodujące różne objawy choroby. Próbkę skóry karpia (CS) i pstrąga

(TS), a także nerek karpia (CK) i wątroby pstrąga (TL) zostały pobrane od zdrowych ryb, a następnie zakażone przygotowanymi zawiesinami bakterii. Po odpowiednio długiej inkubacji próbek przygotowaliśmy ich dziesięciokrotne rozcieńczenia, które posiewaliśmy na podłoże bakteriologiczne agar z krwią. Wyrosłe kolonie bakteryjne liczyliśmy i określaliśmy liczbę jednostek tworzących kolonie (cfu). Wykazano, że wszystkie izolaty powodujące owrzodzenia skóry lub jakiegokolwiek zmiany w narządach wewnętrznych u danego gatunku ryb, wykazywały silną adhezję do skóry karpia i pstrągów, nerki karpia oraz śledziony pstrągów. Pozostałe izolaty z grup *Aeromonas*, które nie powodowały żadnych objawów klinicznych u ryb, wykazywały słabe zdolności przylegania do skóry i narządów wewnętrznych danego gatunku ryb.

Badania zdolności przylegania bakterii do krwinek karpia i pstrągów wykonywałam metodą rozmazu homogenatów nerki karpia (CK) oraz wątroby pstrąga (TL), na który nanosiłam krew pobraną od danych gatunków ryb. Po wybarwieniu, preparaty badałam pod mikroskopem świetlnym. W celu określenia związku pomiędzy zdolnością adhezji bakterii, a spektrum choroby, bakterie podzielono na grupy, w zależności od ich zdolności do wywoływania specyficznych zmian w zakażonych rybach. Nasze badania wykazały obecność licznych komórek bakterii, które mogły wywoływać posocnicę u ryb, związanych z krwinkami. Pozostałe izolaty bakteryjne, nie wywołujące zaburzeń zdrowotnych u ryb, bardzo słabo przylegały do krwinek, a większość z nich była wręcz niezauważalna w preparatach.

Nasze badania wykazały więc, że zdolność adhezji poszczególnych izolatów *Aeromonas* była znacząco wyższa w stosunku do tkanek lub narządów, które były podatne na zakażenia tymi bakteriami. Zaobserwowane zjawisko może być związane z różnymi rodzajami adhezyn bakteryjnych, które zostały już wcześniej opisane, tj. z fimbriami, LPS, błonami zewnętrznymi (OmpA) (Lillier i Daigneault, 1984; Kozińska, 1996; Merino i wsp., 1996; Guzman-Murillo i wsp., 2000; Namba i wsp., 2008). Prawdopodobnie inne mechanizmy pośredniczą w zdolności do adhezji różnych gatunków *Aeromonas* spp. oraz ich przynależnością do danej grupy serologicznej. Wskazuje to, że specyficzne receptory adhezyn tych bakterii są różne na skórze, narządach wewnętrznych i komórkach krwi poszczególnych gatunków ryb. Z danych uzyskanych podczas naszych badań wynika, że *A. hydrophila* jest najgroźniejszym gatunkiem bakterii wśród patogenów ryb z rodzaju *Aeromonas*. Można podejrzewać, że szczepy tego gatunku mają różne rodzaje adhezyn. Ponadto wykazano, że *A. veronii* bt. *sobria* jest szczególnie niebezpiecznym patogenem dla karpia, a *A. salmonicida* i *A. sobria* dla pstrągów. Wykazano także, że wszystkie wymienione gatunki *Aeromonas* są zdolne do wywołania ostrej postaci choroby, w tym posocnicy. Stanowi to dowód korelacji między intensywnością zdolności adhezji bakterii do określonych tkanek ryb, a wywołanym przez nie obrazem choroby.

### **Charakterystyka nowych gatunków bakterii izolowanych od ryb**

Zaburzenia zdrowotne obserwowane u ryb mają różny przebieg w zależności od czynników etiologicznych je wywołujących. Wśród chorób wywoływanych przez bakterie praktycznie nie obserwuje się objawów patognomicznych dla danych jednostek chorobowych. Te same symptomy mogą świadczyć o zaburzeniach zdrowotnych



powodowanych przez różne mikroorganizmy. Dlatego też w ichtiopatologii tak ważna jest gruntowna znajomość przebiegu choroby i możliwych towarzyszących jej objawom. Od kilku lat, w obrazie klinicznym zaburzeń zdrowotnych u ryb opisuję niespecyficzne symptomy, które wcześniej nie były obserwowane lub też przebieg ich był odmienny od dotychczas znanych. Przeprowadzone badania diagnostyczne niejednokrotnie wykazały obecność drobnoustrojów nieznanymi lub słabo poznanych w ichtiopatologii. Przykładem nowo pojawiających się zagrożeń dla stanu zdrowia ryb mogą być infekcje bakterii *Acinetobacter* spp., które objawiają się między innymi punktikowatymi wybroczynami na skórze karpia. Kolejnym przykładem jest *Shewanella putrefaciens* znana do niedawna jako bakteria halofina, a także mikroorganizmy z rodzaju *Micrococcaceae*, nie opisywane wcześniej jako mogące zagrozić zdrowiu ryb. Informacje dotyczące charakterystyki poszczególnych gatunków bakterii, tj. *Acinetobacter* spp., *Shewanella putrefaciens*, a także *Kocuria rhizophila* oraz *Micrococcus luteus* przedstawiono w trzech publikacjach [H3-H5] [Kościńska i wsp.: *Acinetobacter johnsonii* and *Acinetobacter lwoffii* - the emerging fish pathogens. *Bull Vet Inst Pulawy*, 2014, 58, 193 - 199], [Pękala A. i wsp.: *Phenotypical and genotypical characterization of Shewanella putrefaciens* strains isolated from diseased freshwater fish. *J Fish Dis*, 2015, 38, 283 - 293] oraz [Pękala A. i wsp.: *Kocuria rhizophila* and *Micrococcus luteus* as emerging opportunist pathogens in brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). *Aquaculture*, 2018, 486, 285 - 289].

Identyfikację wszystkich bakterii powodujących zaburzenia zdrowotne u ryb przeprowadzałam według tych samych opracowanych i zwalidowanych w Zakładzie Chorób Ryb PIWet-PIB procedur badawczych. Próbkę pobrane ze zmienionych chorobowo tkanek i narządów, tj. skóry, skrzeli oraz z nerki karpia i pstrągów, były homogenizowane, a następnie posiewane na podłoża bakteriologiczne standardowo używane w ichtiopatologii: agar sojowo-tryptozowy (TSA), agar odżywczy z dodatkiem 5% krwi końskiej (BA). Oceniono wzrost bakterii oraz określono liczbę i różnorodność kolonii. Dominujące ich typy reizolowano, a czyste kultury wykorzystywano do dalszych badań laboratoryjnych. W badaniach określałam morfologię, ruchliwość drobnoustrojów oraz ich zdolności do produkcji katalazy i oksydazy cytochromowej. Pierwszym etapem identyfikacji wyizolowanych drobnoustrojów było określenie ich profili biochemicznych umożliwiających wstępną klasyfikację do gatunku, z wykorzystaniem systemów API (bioMérieux).

Z uwagi na fakt, że zestawy API są przeznaczone do identyfikacji drobnoustrojów izolowanych głównie od zwierząt stałocieplnych oraz od ludzi, wyniki otrzymanych badań mogą nie być w pełni poprawne. Dlatego też wykorzystywałam metody molekularne, w tym sekwencjonowanie konserwatywnego regionu genu 16S rDNA, celem określenia przynależności gatunkowej badanych bakterii. Po izolacji genomowego DNA, zgodnie z instrukcją producenta testu, przeprowadzałam PCR z wykorzystaniem uniwersalnych par starterów U8f (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') oraz U1492 (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3'). Produkty amplifikacji wizualizowano elektroforetycznie w 2,0% żelu agarozowym, a następnie po ich oczyszczeniu, poddawano sekwencjonowaniu za pomocą analizatora DNA 3730xI Genomed S.A. Otrzymane sekwencje analizowaliśmy przy użyciu oprogramowania MEGA 5.05. Podobieństwo pomiędzy

sekwencjami zarówno badanych izolatów, jak i tych dostępnych w GenBank określaliśmy przy użyciu oprogramowania MEGA 5.05.

Pierwszymi bakteriami nie izolowanymi wcześniej od ryb, które zwróciły naszą uwagę podczas przeprowadzania badań pstrągów i karpia wykazujących zaburzenia zdrowotne, były *Acinetobacter* spp. oraz *Shewanella putrefaciens*. Bakterie *Acinetobacter* spp. były uważane za mikroorganizmy saprofityczne, szeroko rozpowszechnione w przyrodzie, występujące powszechnie w glebie, rybach morskich i wodzie (Baumann, 1968; Čož-Rakovac i wsp., 2002; Grawiński i wsp., 2009), rybach słodkowodnych (González i wsp., 2000) i warzywach (Berlau, 1999; Gennari i Stegagno, 1986). W ostatnich latach stosunkowo często izolowaliśmy *Acinetobacter* spp. z uszkodzonych tkanek karpia oraz od pstrągów tęczowych, dwóch głównych gatunków ryb hodowanych w Polsce. Obserwowane objawy chorobowe występowały w różnych porach roku, najczęściej w maju i wrześniu (Pękala, 2007). Bakterie te często dominowały w uszkodzonych tkankach. Dlatego też skupiliśmy się na charakterystyce zgromadzonych gatunków *Acinetobacter* izolowanych od ryb wykazujących zaburzenia zdrowotne.

Nasze badania wykazały obfity wzrost bakterii w próbkach pobranych z tkanek i narządów ryb, natomiast znacznie mniej wyizolowano ich z próbek nerki. W posiewach na podłożu BA dominowały białe lub szarozielone, gładkie kolonie o średnicy 1 - 2 mm. W czystych kulturach bakterie te wybarwiały się Gram-ujemnie, układając w łańcuszki lub nieregularne kształty, nie wykazywały zdolności ruchu, nie wytwarzały oksydazy, natomiast były katalozo-dodatnie. Badane drobnoustroje były biochemicznie niereaktywne, zarówno w testach API 20E jak i API 20NE, w wyjątku jednego szczepu, który reagował w teście hydrolizy żelatyny. Identyfikacja bakterii *Acinetobacter* do gatunku była możliwa dzięki analizie opartej na podobieństwach sekwencji genów 16S rDNA zebranych izolatów z sekwencjami dostępnymi w bazie danych GenBank. Przeprowadzone badania wykazały podobieństwo poszczególnych zgromadzonych izolatów na poziomie 99,1% - 100% z *A. johnsonii*, *A. lwoffii*, *A. calcoaceticus*, *A. junii* i *A. haemolyticus*.

Należy zaznaczyć, że w większości przypadków infekcjom bakterii *Acinetobacter* spp. u ryb towarzyszyły inne mikroorganizmy, głównie z rodzaju *Aeromonas* lub *Chryseobacterium meningosepticum*. Jednak to *Acinetobacter* spp. stanowiły dominującą florę w posiewach bakteriologicznych. Warto również wskazać, że bakterie *Acinetobacter* spp. są powszechnie znane jako nośniki genów oporności na chemioterapeutyki. Dlatego też mogą mieć one duże znaczenie w rozprzestrzenianiu się oporności na leki. Opisane wyniki zostały przedstawione w artykule [H3] [Kozińska A. i wsp.: *Acinetobacter johnsonii* and *Acinetobacter lwoffii* - the emerging fish pathogens. *Bull Vet Inst Pulawy*, 2014, 58, 193 - 199].

Inną bakterią od niedawna izolowaną od chorych ryb jest *Shewanella putrefaciens*. Gatunek ten obejmuje głównie drobnoustroje pozyskiwane powszechnie z wód morskich i słonawych oraz z ryby morskie (Al-Harbi i Naim Uddin, 2005; Buller, 2004). Bakterie te są najważniejszymi drobnoustrojami powodującymi psucie się mrożonych ryb, często izolowanymi również z mięsa drobiowego i produktów z wołowiny (Borch i wsp., 1996; Gennari i Campanini, 1991; Gram i Huss, 1996). *S. putrefaciens*, bakteria uważana za halofilną, w ostatnich latach, w hodowlanych karpia i pstrągów, jak również wśród gatunków ryb dziko żyjących w Polsce, wywoływała zaburzenia zdrowotne manifestujące się

zmianami skórnymi. Towarzyszy im podwyższona śmiertelność ryb. Objawy kliniczne obserwowaliśmy głównie wiosną, gdy temperatura wody wzrosła do 7°C - 10°C. W celu wyizolowania czynnika chorobowego, do badań bakteriologicznych pobierałam próbki ze zmian skórnych, skrzel i narządów wewnętrznych (nerek, śledziony).

Nasze badania wykazały, że w próbkach pobranych od poszczególnych ryb wykazujących objawy chorobowe, na podłożu TSA, wzrastały charakterystyczne dla rodzaju *Shewanella*, pomarańczowe kolonie. Wzrost ich odbywał się w monokulturze lub stanowił 55% - 90% całkowitej flory bakteryjnej. Jednolity wzrost lub też wzrost z dominacją bakterii *Shewanella* widoczny był również na podłożu BA. W próbkach pobranych od ryb nie wykazujących objawów chorobowych, sporadycznie obserwowaliśmy niewielką liczbę zróżnicowanych kolonii bakteryjnych, wśród których te o pomarańczowym zabarwieniu stanowiły 5% - 20%.

Nasze badanie wykazały, że wszystkie wyizolowane szczepy były Gram-ujemnymi, ruchliwymi bakteriami, wykazującymi dodatnie reakcje w teście na oksydazę cytochromową. System API 20E poprawnie zidentyfikował wszystkie badane terenowe izolaty, jak również szczepy referencyjne *S. putrefaciens*, wskazując podobieństwo w numerycznych profilach biochemicznych (0502004, 0702004, 0402004, 0502006) oraz określając poziom identyfikacji bakterii jako doskonały (99,9%) lub bardzo dobry (99,0% - 99,3%). W systemie API 20NE zaobserwowano zróżnicowanie w profilach numeryczne (1410354, 1410754, 1411344, 1411354, 1451344, 1450354), niemniej wszystkie z nich odpowiadały znakomitym (99,9%), bardzo dobrym (98,9%) lub dobrym (93,8% - 97,0%) poziomom identyfikacji. Niektóre z izolatów zostały jednak błędnie zaliczone do *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. Wszystkie badane bakterie wykazywały dużą reaktywność w testach biochemicznych. Bardzo ciekawym odkryciem było wykazanie, że zgromadzone izolaty bakterii do swojego wzrostu nie wymagają NaCl. Zjawisko to świadczyć może o zdolnościach adaptacyjnych bakterii *Shewanella* do środowiska słodkowodnego.

Dodatkowo, system API Zym, który włączyłam do naszych badań, wykazał, że wszystkie badane izolaty były zdolne do wytwarzania fosfatazy alkalicznej, arylamidazy leucyny i waliny, trypsyny, kwaśnej fosfatazy i N-acetylo-β-glukozoaminidazy. Wskazane właściwości enzymatyczne mogą mieć wpływ na zjadliwość badanych bakterii. Opisane wyniki zostały przedstawione w artykule [H4] [Pękala A. i wsp.: **Phenotypical and genotypical characterization of *Shewanella putrefaciens* strains isolated from diseased freshwater fish. *J Fish Dis*, 2015, 38, 283 - 293].**

Bakterie z rodzaju *Micrococcaceae*, do których należą m. in. *Kocuria rhizophila* oraz *Micrococcus luteus*, nie były wcześniej opisywane jako zagrażające zdrowiu ryb. Zaliczane są one do typowych komensali skóry, krtani i gardła ssaków. Występują także w różnych środowiskach, zasiedlając glebę, osady morskie, a także mięso drobiowe, świeżą wodę lub żywność (Becker i wsp., 2008; Lee i wsp., 2009; Kim i wsp., 2004). Tymczasem, w dostępnej literaturze nie znalazłam informacji o wpływie *Kocuria* sp. na stan zdrowotny ryb. Wiadomym jest również, że *Kocuria* sp. wchodzi w skład fizjologicznej mikroflory jelita pstrąga (Kim i wsp., 2007). Wykazano jednocześnie, że bakterie te hamują wzrost innej mikroflory, co wykorzystano z sukcesem do kontroli zakażeń bakteriami *Aeromonas salmonicida* u pstrągów tęczowych (Irianto i Austin, 2002). W Polsce, w ostatnich latach

obserwowano kilka przypadków zaburzeń zdrowotnych u ryb, związanych głównie z obustronnym wytrzeszczem gałek ocznych oraz masowymi śnięciami.

Do badań bakteriologicznych pobrano próbki tkanek ze zmienionej chorobowo skóry, a także nerek i wątroby ryb. Po 72 - 96-godzinnej inkubacji próbek, na pożywkach BA i TSA pojawił się jednolity wzrost żółtych kolonii bakterii o średnicy 2-3 mm. Wszystkie wyizolowane drobnoustroje były Gram-dodatnimi ziarniakami układającymi się w triady. Zostały one zidentyfikowane jako *Kocuria varians* oraz *Micrococcus luteus* przez użyciu, odpowiednio testów API 20 Staph oraz systemu Vitek 2. Badania przeprowadzone w systemie API 20 Staph wykazały ogólnie słabą reaktywność tych bakterii. W wyniku sekwencjonowania, zebrane izolaty zostały zidentyfikowane jako *Kocuria rhizophila* z podobieństwem wynoszącym  $\geq 98,5\%$  do sekwencji referencyjnych pochodzących z bazy GeneBank. Izolaty *Micrococcus luteus* wykazywały 100% podobieństwo.

Moje własne obserwacje skłaniają do stwierdzenia, że izolacja *Kocuria* sp. wymaga dłuższego, w porównaniu do innych znanych i izolowanych bakteryjnych czynników chorobowych ryb, okresu inkubacji na stałych pożywkach bakteriologicznych. Opisane wyniki zostały przedstawione w artykule [H5] [Pękala A. i wsp.: *Kocuria rhizophila* and *Micrococcus luteus* as emerging opportunist pathogens in brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). *Aquaculture*, 2018, 486, 285 - 289].

#### **Określenie potencjału chorobotwórczego nowo izolowanych bakterii pod kątem zagrożeń dla stanu zdrowia ryb**

Wśród bakteryjnych czynników etiologicznych wywołujących schorzenia ryb, tylko trzy zalicza się do ścisłych ich patogenów. Są to: *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum* oraz *Renibacterium salmoninarum*. Pozostałe drobnoustroje określa się mianem bakterii warunkowo chorobotwórczych, które w wyniku spadku odporności u ryb, spowodowanym m.in. niesprzyjającymi warunkami środowiskowymi, mogą wywołać chorobę. Wyizolowanie więc nieznannej w ichtiopatologii bakterii nie świadczy jeszcze o jej chorobotwórczym potencjale. Dopiero po wypełnieniu postulatów Kocha, można mówić o realnym zagrożeniu daną bakterią dla ryb. W swoich badaniach postępowałam właśnie według tego schematu, aby sprawdzić potencjał chorobotwórczy wybranych izolatów bakterii *Acinetobacter*, *Shewanella*, *Kocuria* i *Micrococcus* dla ryb.

W celu przeprowadzenia doświadczeń na rybach używałam pstrągów tęczowych i / lub karpia nie wykazujących objawów klinicznych. Przed rozpoczęciem każdego eksperymentu ryby przystosowywałam do warunków laboratoryjnych, a tuż przed zakażeniem, poddawałam je znieczuleniu. Objawy chorobowe obserwowałam codziennie, zwykle przez cztery tygodnie.

Przez ostanie lata względnie często izolowaliśmy bakterie *Acinetobacter* spp. ze zmienionych chorobowo tkanek karpia i pstrąga tęczowego. W dostępnej literaturze istnieją tylko dwa doniesienia dotyczące patogenności *A. baumannii* potwierdzone przeprowadzeniem zakażenia eksperymentalnego na rybach (Rauta i wsp., 2011; Xia i wsp., 2008). Dlatego też rola *Acinetobacter* w patologii ryb jest wciąż niejasna. W ostatniej dekadzie rozważano związek pomiędzy *Acinetobacter* spp., a patologicznymi zmianami obserwowanymi u różnych gatunków ryb w niektórych krajach, takich jak Chorwacja (Čož-

Rakovac i wsp., 2002) i Chiny (Xia i wsp., 2008). Dwa przypadki infekcji *Acinetobacter* spp. odnotowano również w Polsce (Pękala, 2007; Zacharow, 2010).

W badaniach eksperymentalnych sprawdzałam chorobotwórczość dwóch wybranych szczepów *A. johnsonii* i *A. lwoffii* dla odpowiednio pstrąga tęczowego i karpia. Objawy chorobowe były podobne do tych obserwowanych u ryb zakażonych w warunkach naturalnych. Interesujące jest, że niektóre z symptomów, w szczególności wytrzeszcz gałek ocznych, wybroczyny i owrzodzenia obecne na powierzchni ciała, były podobne do opisanych w przypadku ryb zakażonych *A. baumannii* (Rauta i wsp., 2011; Xia i wsp., 2008). Fakt ten wskazuje, że różne gatunki *Acinetobacter* spp. prawdopodobnie mają podobne czynniki wirulencji. Jednak w naszych doświadczeniach wykazano obecność wybroczyn w narządach wewnętrznych ryb, podczas gdy u sumików kanałowych zakażonych *A. baumannii* obserwowano bladą wątrobę (Xia i wsp., 2008). Opisane wyniki zostały szczegółowo przedstawione w artykule [H3] [Kozińska A. i wsp.: *Acinetobacter johnsonii* and *Acinetobacter lwoffii* - the emerging fish pathogens. *Bull Vet Inst Pulawy*, 2014, 58, 193 - 199].

Bakterie *S. putrefaciens* izolowano w różnych gospodarstwach w Polsce od ryb słodkowodnych, u których obserwowano zaburzenia zdrowotne połączone ze śnięciami wynoszącymi nawet do 20% obsady. Chore ryby wykazywały jeden lub więcej z następujących objawów: osłabienie kondycji, apatię, pociemnienie skóry, obrzęk odbytu, blade skrzela z ogniskową martwicą. Ponadto, stwierdzałam martwicze zmiany na skórze oraz owrzodzenia. W badaniu anatomopatologicznym obserwowałam przekrwienie narządów wewnętrznych, obrzęk nerek, a także znaczne powiększenie śledziony. Takie symptomy obecne były również wśród populacji dzikich gatunków ryb. Do tej pory opublikowano tylko kilka prac dotyczących infekcji wywołanych przez ten mikroorganizm: dwa raporty opisywały gatunki ryb morskich *Siganus rivulatus* (Saeed i wsp. 1987) oraz *Dicentrarchus labrax* L. (Korun i wsp., 2009), a także ryby słodkowodne, a mianowicie karpie i pstrągi tęczowe (Kozińska i Pękala, 2004) oraz *Misgurnus anguillicaudatus* (Cantor) (Qin i wsp., 2012). Z powyższych powodów przeprowadziliśmy badania eksperymentalne na rybach celem potwierdzenia chorobotwórczości *S. putrefaciens*.

Właściwości chorobotwórcze bakterii *Shewanella putrefaciens*, sprawdzałam w analogiczny sposób jak w przypadku *Acinetobacter*. Do badań eksperymentalnych użyłam zarówno karpia jak i pstrągów, które zakażałam wybranymi izolatami bakterii. Wybór drobnoustrojów do przeprowadzenia zakażenia oparłam na objawach klinicznych obserwowanych u naturalnie zakażonych ryb, jak też kierując się właściwościami biochemicznymi bakterii.

W wyniku eksperymentalnego zakażenia karpia i pstrągów wykazano podobieństwo obserwowanych objawów klinicznych u ryb, które rozwijały się w trakcie doświadczenia, do przebiegu naturalnych infekcji. Niektóre oznaki choroby, takie jak blade skrzela, obecność owrzodzeń, powiększenie śledziony, zostały opisane u ryb morskich, takich jak labraks (Korun i wsp., 2009), a także wśród słodkowodnych piskorzów (Qin i wsp., 2012) oraz karpia ([www.environment-agency.gov.uk](http://www.environment-agency.gov.uk)). Warto zauważyć, że odsetek śmiertelności wśród ryb, który oszacowano na 40% - 85% (Kozińska i Pękala, 2004; Korun i wsp., 2009) jest podobny do naszych wyników eksperymentu. Reizolacja *S. putrefaciens* ze świeżo śniętych ryb

wykorzystanych w doświadczeniach, spełniła postulaty Kocha. Opisane wyniki zostały przedstawione w artykule [H4] [Pękala A. i wsp.: **Phenotypical and genotypical characterization of *Shewanella putrefaciens* strains isolated from diseased freshwater fish. *J Fish Dis*, 2015, 38, 283 - 293**].

W ostatnich latach, w gospodarstwach hodowli ryb położonych w różnych częściach Polski odnotowanych zostało kilka przypadków infekcji pstrąga tęczowego i pstrąga potokowego spowodowanych przez bakterie *Kocuria rhizophila* i *Micrococcus luteus*. Wśród obserwowanych objawów chorobowych należy wymienić wytrzeszcz gałek ocznych, obrzęk brzucha, zwiększoną pigmentację skóry z ogniskowymi zmianami oraz wybroczynami. W badaniu anatomopatologicznym stwierdzałam stan zapalny jelit, przekrwienie wątroby oraz wybroczyny w mięśniach części ogonowej. W każdym z przypadków śmiertelność ryb oszacowano na około 50% obsady. W dostępnej literaturze znajduje się tylko kilka doniesień o izolacji bakterii *Kocuria* sp. i *Micrococcus* sp. z hodowlanych ryb łososiowatych, jednak żadne z nich nie zawiera informacji na temat stanu zdrowia tych zwierząt. Dlatego przeprowadzono zakażenia eksperymentalne w celu stwierdzenia, czy *Kocuria rhizophila* i *Micrococcus luteus* mają lub potencjalnie mogą wykazywać właściwości chorobotwórcze dla ryb.

Przeprowadzone doświadczenia wywołały 75% śmiertelności zakażonych ryb, począwszy od szóstego dnia po infekcji. Wśród objawów chorobowych obserwowaliśmy pociemnienie skóry, wytrzeszcz gałek ocznych, obecność płynu wysiękowego w jamie ciała, wybroczyny w pęcherzu pławnym oraz obrzęk nerek. Doświadczenia na pstrągach tęczowych przeprowadzone w warunkach laboratoryjnych z wykorzystaniem izolatów *Kocuria* i *Micrococcus*, potwierdziły postulaty Kocha. Jednak rola tych mikroorganizmów w patologii ryb nadal nie jest jasna i powinna być dalej badana. Chociaż przedstawione wyniki wykazały chorobotwórcze właściwości tych bakterii, konieczne jest prowadzenie dalszych badań w tym zakresie. Szczegółowe wyniki badań zostały przedstawione w artykule [H5] [Pękala A. i wsp.: ***Kocuria rhizophila* and *Micrococcus luteus* as emerging opportunist pathogens in brown trout (*Salmo trutta Linnaeus, 1758*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum, 1792*). *Aquaculture*, 2018, 486, 285 - 289**].

### **Osiągnięcia:**

- Wyniki naszych badań wykazały, że *Aeromonas hydrophila* jest najgroźniejszym dla ryb gatunkiem wśród bakterii z rodzaju *Aeromonas*; ponadto udowodniono, że *A. veronii* bt. *sobria* jest szczególnie chorobotwórczy dla karpia, a *A. salmonicida* oraz *A. sobria* dla pstrągów.
- W wyniku przeprowadzonych badań wykazano słabą korelację pomiędzy serogrupami bakterii *Aeromonas*, a obrazem klinicznym choroby; wyraźną zależność zauważono natomiast w intensywności adhezji bakterii do specyficznych tkanek ryb i wywołanym przez nie spektrum choroby. Zdolność adhezji bakterii *Aeromonas* do różnych komórek organizmu ryb jest głównym wskaźnikiem pomocnym w określaniu ich zjadliwości, a co za tym idzie określaniem ewentualnego zakresu choroby, jaki może wystąpić u ryb.
- Uzyskane wyniki badań wpłynęły na nowe podejście do znanych już infekcji wywołanych przez bakterie *Aeromonas* u ryb; ponadto, są one pomocne w ocenie ryzyka wystąpienia

zaburzeń zdrowotnych w poszczególnych gospodarstwach rybackich za pomocą badań epizootycznych lub / i podczas rutynowych badań ryb.

- Uzyskane wyniki dostarczyły istotnych danych związanych z możliwością kontroli zakażeń wywołanych przez *Acinetobacter* spp. oraz umożliwiły ocenę ryzyka związanego z wystąpieniem tego mikroorganizmu w hodowlach ryb.
- Przeprowadzono szczegółowe badania nad charakterystyką fenotypową i genotypową zgromadzonych bakterii *Acinetobacter*, *Shewanella putrefaciens*, a także *Kocuria rhizophila* i *Mircrococcus luteus*, dzięki czemu możliwa stała się łatwiejsza diagnostyka tych drobnoustrojów.
- Po raz pierwszy na świecie, od ryb łososiowatych wykazujących zaburzenia zdrowotne wyizolowano bakterię *Kocuria rhizophila*, a po raz drugi *Mircrococcus luteus*.
- W wyniku przeprowadzonych badań spełnione zostały postulaty Kocha, dzięki czemu wykazano, że *Acinetobacter* spp., *Shewanella putrefaciens* oraz *Kocuria rhizophila* i *Mircrococcus luteus* należy uznać za oportunistyczne, potencjalnie chorobotwórcze dla ryb bakterie.

#### Piśmiennictwo:

- Al-Harbi A. H., Naim Uddin M.: Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in brackish water in Saudi Arabia. *Aquaculture*, 2005, 250, 566 - 572.
- Austin B., Austin D. A.: Bacterial fish pathogens. Disease of farmed and wild fish. Praxis Publishing, Ltd, Chichester, UK, 2007.
- Baumann P.: Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. *J Bacteriol.*, 1968, 96, 39 - 42.
- Becker K., Rutsch F., Uekotter A., Kipp F., König J., Marquardt T., Peters G., von Eiff C.: *Kocuria rhizophila* adds to the emerging spectrum of micrococcal species involved in human infections. *J Clin Microbiol*, 2008, 46, 3537 - 3539.
- Berlau J., Aucken H., Houang M., Epitt T.L.: Isolation of *Acinetobacter* spp. including *A. baumannie* from vegetables: Implications for hospital-acquired infections. *J Hosp Infect*, 1999, 42, 201 - 204.
- Borch E., Kant-Muermans M. L., Blixt Y.: Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int J Food Microbiol*, 1996, 33, 103 - 120.
- Buller N. B.: Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual. CABI Publishing, London, 2004, 31, 181.
- Carnahan A. M., Joseph S. W.: Family I. *Aeromonadaceae*. W: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, D. J. Brenner N.R. Krieg, J. T. Staley (eds), Vol. 2, Springer, Michigan State University, USA, 2005.
- Christofilogiannis P.: Mediterranean fish farming. Caring for health and welfare of fish: A critical success factor for aquaculture. Brussels, 16-14. 05. 2013, 4 - 7.
- Čož-Rakovac R., Strunjak-Perović I., Popović N.T., Hacmanjek M., Šimpraga B., Teskeredžić E.: Health status of wild and cultured sea bass in the northern Adriatic Sea. *Vet Med – Czech*, 2002, 47, 222 - 226.
- Esteve C., Alcaide E., Canals R., Merino S., Blasco D., Figueras M. J., Tomás M. J.: Pathogenic *Aeromonas hydrophila* serogroup O:14 and O:81 strains with an S layer. *Appl Environ Microb*, 2004, 70, 10, 5898 - 5904.

- Esteve C., Amaro C., Garay E., Santos Y., Toranzo A. E.: Pathogenicity of live bacteria and extracellular products of motile *Aeromonas* isolated from eels. *J Appl Bacteriol*, 1995, 78, 5, 555 - 562.
- Gennari M., Campanini R.: Isolation and characterization of *Shewanella putrefaciens* from fresh and spoiled fish, fresh and spoiled meat, dairy products, water and soil. *Industrial Alimentaria*, 1991, 30, 965 - 976.
- Gennari M., Stegagno F.: Isolation and characterization of *Acinetobacter calcoaceticus* from raw, washed and frozen vegetables. *Archiv Vet Ital*, 1986, 37, 131 - 137.
- González C. J., Santos J. A., García-López M. L., Otero A.: *Psychrobacters* and related bacteria in freshwater fish. *J Food Protect*, 2000, 63, 315 - 321.
- Gram L., Huss H. H.: Microbiological spoilage of fish and fish products. *Int J Food Microbiol*, 1996, 33, 121 - 137.
- Grawiński E., Podolska M., Kozińska A., Pękala A.: Bacteria pathogenic for fish and humans isolated from Baltic cod. *Życie Wet.*, 2009, 84, 409 - 416.
- Guzman-Murillo M. A., Merino-Contreras M. L., Ascencio F.: Interaction between *Aeromonas veronii* and epithelial cells of spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) in culture. *J Appl Microbiol*, 2000, 88, 5, 897 - 906.
- Irianto A., Austin B.: Probiotics in aquaculture. *J Fish Dis*, 2002, 25, 633 - 642.
- Janda J. M., Abbott S. L.: The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin Microbiol Rev*, 2010, 23, 1, pp. 35 - 73.
- Jara Z., Chodynieski A.: *Ichtiopatologia*. AR, Wrocław 1999, ss. 12 - 15.
- Kim D. H., Brunt J., Austin B.: Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Appl Microbiol*, 2007, 102, 1654 - 1664.
- Kim S. B., Nedashkovskaya O. I., Mikhailov V. V., Han S. K., Kim K. O., Rhee M. S., Bae K. S.: *Kocuria marina* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from marine sediment. *Int J Syst Evol Micr*, 2004, 54, 1617 - 1620.
- Korun J., Akgun-Dar K., Yazici M.: Isolation of *Shewanella putrefaciens* from cultured European sea bass, (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey. *Revue de Medecine Veterinaire-Toulouse* 2009, 160, 532 - 536.
- Kozińska A.: Dominant pathogenic species of mesophilic aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. *J Fish Dis*, 2007, 30, 5, 293 - 301.
- Kozińska A.: Pathogenicity markers of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* and *Aeromonas sobria*. PhD Thesis, National Veterinary Research Institute, Puławy, Poland, 1996.
- Kozińska A., Pękala A.: First isolation of *Shewanella putrefaciens* from freshwater fish - a potential new pathogen of the fish. *Bull Eur Assoc Fish Pat*, 2004, 24, 199 - 203.
- Kozińska A., Pękala A.: Serotyping of *Aeromonas* species isolated from Polish fish farms in relation to species and virulence phenotype. *Bull Vet Inst Pulawy*, 2010, 54, 3, 315 - 320.
- Lillier R., Daigneault P: Antigenic differentiation of pili from non-virulent and fish-pathogenic strains of *Aeromonas hydrophila*. *J Fish Dis*, 1984, 7, 6, 509 - 512.



- Lee J. Y., Kim S. H., Jeong H. S., Oh S. H., Kim H. R., Kim Y. H., Lee J. N., Kook J. K., Kho W. G.: Two cases of peritonitis caused by *Kocuria marina* in patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Clin Microbiol*, 2009, 47, 3376 - 3378.
- Majumdar T., Ghosh S., Pal J., Mazumder S.: Possible role of a plasmid in the pathogenesis of fish disease caused by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 2006, 256, 1-4, 95 - 104.
- Merino S., Rubires X., Aguilar A., Tomás J. M.: The O:34-antigen lipopolysaccharide as an adhesin in *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiology Letters*, 1996, 139, 2-3, 97 - 101.
- Monfort P., Baleux B.: Dynamics of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria* and *Aeromonas caviae* in a sewage treatment pond. *Appl Environ Microb*, 1990, 56, 7, 1999 - 2006.
- Namba A., Mano N., Takano H., Beppu T., Ueda K., Hirose H.: OmpA is an adhesion factor of *Aeromonas veronii*, an opportunistic pathogen that habituates in carp intestinal tract. *J Appl Microbiol*, 2008, 105, 5, 1441-1451.
- Noterdaeme L., Bigawa S., Williams K. A., Ollevier F.: Biochemical and physiological characteristics and plasmid profiles of *Aeromonas hydrophila* strains isolated from freshwater fish and from fresh water. *J Fish Dis*, 1991, 14, 3, 313 - 321.
- Ogara W. O., Mbutia P. G., Kaburia H. F. A., Sorum H., Kagunya D. K., Nduthu D. I., Colquhoun D.: Motile aeromonads associated with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mortality in Kenya. *Bull Eur Assoc Fish Pat*, 1998, 18, 1, 7 - 9.
- Olsen N. J., Ojala A.: Overview of the disease situation and surveillance in Europe in 2013. W: Report: 18<sup>th</sup> Annual workshop of the National Reference Laboratories for fish diseases, Organized by the European Union Reference Laboratory for Fish Diseases, National Veterinary Institute, Technical University of Denmark, Copenhagen, Denmark, 3 – 4.06.2014, 14 - 17.
- Olesen N. J., Vendramin N.: Overview of the disease situation and surveillance in Europe in 2015. W: Report: 20<sup>th</sup> Annual workshop of the National Reference Laboratories for fish diseases, Organized by the European Union Reference Laboratory for Fish Diseases, National Veterinary Institute, Technical University of Denmark, Copenhagen, Denmark, 31.05 – 1.06.2016, 13 - 15.
- Olesen N. J., Vendramin N., Andersen N. R.: Overview of the fish disease situation and surveillance in Europe in 2017. W: Report: 22<sup>th</sup> Annual workshop of the National Reference Laboratories for fish diseases, Organized by the European Union Reference Laboratory for Fish Diseases, National Institute of Aquatic Resources, Technical University of Denmark, Kgs. Lyngby, Denmark, 30 - 31.05.2018.
- Qin L, Zhu M. & Xu L.: First report of *Shewanella* sp. and *Listonella* sp. infection in freshwater cultured loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquac Res*, 2012, doi: 10.1111/j.1365-2109.2012.03260.x.
- Pękala A.: Nowe zagrożenia infekcji bakteryjnych u karpia. W: Ochrona zdrowia w gospodarce rybackiej. edited by J. Żelazny, NVRI Pulawy, 2007, 59 - 64.

- Rahman M., Colque-Navarr P., Kühn I., Huys G., Swings J., Möllby R.: Identification and characterization of pathogenic *Aeromonas veronii* biovar *sobria* associated with epizootic ulcerative syndrome in fish in Bangladesh. Appl Environ Microb, 2002, 68, 2, 650 – 655.
- Rauta P. R., Kumar K., Sahoo P.K.: Emerging new multi-drug resistant bacterial pathogen, *Acinetobacter baumannii* associated with snakehead *Channa striatus* eye infection. Curr Sci, 2011, 101, 548 - 553.
- Sakazaki R., Shimada T.: O-serogrouping for mesophilic *Aeromonas* strains. Japanese Journal of Medical Science & Biology, 1984, 37, 247 - 255.
- Santos Y., Bandin I., Toranzo A. E.: Immunological analysis of extracellular products and cell surface components of motile *Aeromonas* isolated from fish. J Appl Bacteriol, 1996, 81, 6, 585 - 593.
- Saeed M. O., Alamoudi M. M., Al-Harbi A. H.: A *Pseudomonas* associated with disease in cultured rabbitfish *Siganus rivulatus* in the Red Sea. Dis Aquat Organ, 1987, 3, 177 - 180.
- Wahli T., Burr S. E., Pugovkin D., Mueller O., Frey J.: *Aeromonas sobria*, a causative agent of disease in farmed perch, *Perca fluviatilis* L. J Fish Dis, 2005, 28, 3, 141 - 150.
- Xia, Xiong D., Gu Z., Xu Z., Chen C., Xie J., Xu P.: Recovery of *Acinetobacter baumannii* from diseased channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in China. Aquaculture, 2008, 284, 285 -288.
- Zacharow I., Snoch-Bajek J., Niemczuk W.: Microbiological evaluation of farmed carp from particular ponds in province dolnośląskie. Acta Sci Pol, Medicina Veterinaria 2010, 9, 33 - 38.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

Od początku mojej aktywności zawodowej zaangażowana byłam w działalność naukowo-badawczą realizowaną w Zakładzie Chorób Ryb PIWet-PIB. Uczestniczyłam w realizacji 28 projektów badawczych, z których 21 stanowiło tematy działalności statutowej Instytutu, 6 to granty krajowe i zagraniczne, a także realizowałam jedno zadanie programu wieloletniego. Dokładne dane dotyczące tematyki wspomnianych projektów naukowo-badawczych przedstawiono z załączniku nr 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego. W załączniku tym zamieszczono również pełen wykaz moich osiągnięć: spis publikacji naukowych, działalności dydaktycznej, przygotowywanych recenzji, nagród, udziału w konferencjach naukowych, członkostwa w organizacjach naukowych, staży i szkoleń oraz pozostałej aktywności wynikającej z działań w zakresie referencyjności, systemu zarządzania jakością Zakładu Chorób Ryb PIWet-PIB.

Zakres tematyczny mojej działalności naukowej, z wyłączeniem prac opisanych w jednotematycznym cyklu publikacji, można podzielić na główne kierunki zaprezentowane i opisane poniżej.

### Diagnostyka chorób wirusowych ryb

Początki mojej pracy zawodowej związane był z badaniami nad wirusowymi chorobami ryb hodowlanych, zarówno łososiowatych, jak i karpowatych. W tamtym czasie sytuacja epizootyczna w odniesieniu do chorób wirusowych ryb w Polsce była nieznana. Dlatego też w Zakładzie Chorób Ryb PIWet-PIB rozpoczęłam pracę nad wdrożeniem metod

diagnostycznych stosowanych w izolacji i identyfikacji najgroźniejszych wirusów ryb, takich jak: wirusowej posocznicy krwotocznej (VHSV), zakaźnej martwicy układu krwiotwórczego (IHNV), zakaźnej martwicy trzustki (IPNV) oraz wiosennej wiremii karpi (SVCV). Zgodnie z wytycznymi Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (O.I.E.) „Manual of diagnostic tests for aquatic animals”, a także dyrektywy Rady nr 91/67/EWG, identyfikacja wirusów powinna być wykonywana po inkubacji homogenatu z badanej próbki na stałych liniach komórkowych. Do moich głównych zadań należała więc izolacja wyżej wymienionych czynników chorobotwórczych na stałych liniach komórkowych, początkowo na BF-2 (*Bluegill fry cel line - 2*) oraz EPC (*Epithelioma papulosum*), a następnie na FHM (*Fathead minnow*) i RTG-2 (*Rainbow trout gonad cel line - 2*).

W tamtym okresie do identyfikacji wirusów VHSV, IPNV oraz SVCV wykorzystywano głównie test ELISA, który niestety nie był opracowany dla wirusa IHNV. Dzięki moim badaniom do diagnostyki chorób wirusowych ryb w Zakładzie Chorób Ryb PIWet zostały wprowadzone dwie nowe metody: seroneutralizacja oraz immunofluorescencja. Osiągnięcie to umożliwiło wkrótce wykrycie w Polsce wirusa zakaźnej martwicy układu krwiotwórczego (IHNV). Pierwszy przypadek izolacji i identyfikacji wirusa IHNV został potwierdzony metodą RT-PCR oraz badaniami w mikroskopie elektronowym. Dzięki pełnemu pakietowi diagnostycznych badań wirusologicznych możliwe stało się wprowadzenie programu nadzoru nad chorobami zwalczanymi ówczesnie z urzędu/podlegającymi rejestracji, którymi na mocy dyrektywy Rady 91/67/EWG były VHS, IHN oraz IPN i SVC. Programy takie od lat były już wdrożone i realizowane w krajach Europy Zachodniej, a Polska, jako państwo pretendujące do wstąpienia w struktury członkowskie Unii Europejskiej, musiała wykazać się gotowością i biegłością diagnostyczną do przeprowadzania badań nad najgroźniejszymi chorobami ryb hodowlanych.

Wyniki wyżej opisanych badań zostały przedstawione w następujących publikacjach:

- Antychowicz J., Reichert M., **Pękała A.**, Matusiewicz J.: Przypadek zakaźnej martwicy układu krwiotwórczego i wirusowej posocznicy krwotocznej u wylęgu pstrąga tęczowego wprowadzenie metody RT-PCR do diagnostyki tych wirusów w Polsce. *Med. Weter.* 2001, 57, 894 - 898.
- Antychowicz J., **Pękała A.**: Wirusowa krwotoczna posocznica (VHS) i zakaźna martwica układu krwiotwórczego (IHN) u ryb w Polsce i krajach europejskich. *Med. Weter.* 2002, 58, 341 - 343.

#### Jersinioza ryb łososiowatych z uwzględnieniem immunoprofilaktyki tej choroby

Po dwóch latach pracy naukowej moja aktywność zawodowa została skierowana na badania chorób ryb o etiologii bakteryjnej. Najgroźniejszą jednostką chorobową w tamtym okresie, powodującą poważne straty ekonomiczne w hodowlach ryb łososiowatych, była jersinioza, nazywana inaczej chorobą czerwonej gęby (ang. ERM, Enteric redmouth disease). Dlatego też zajęłam się badaniami nad tą Gram ujemną bakterią, *Yersinia ruckeri*, która jest czynnikiem etiologicznym jersiniozy. Choroba ta atakuje głównie narybek pstrąga, często występuje endemicznie, a na jej rozwój wpływ mają głównie czynniki stresogenne. Jednak obecność bakterii *Y. ruckeri* w populacji ryb nie zawsze prowadzi do rozwoju klinicznej

postaci ERM. Za wystąpienie objawów choroby odpowiedzialny jest serotyp O1, a rozprzestrzenienie poszczególnych serotypów na świecie nie jest równomierne.

W Polsce praktycznie nie prowadzono dokładnych badań nad jersiniozą, dlatego też rozpoczęłam prace nad analizą 126 zgromadzonych przeze mnie izolatów *Y. ruckeri* pochodzących od pstrągów tęczowych z hodowli zlokalizowanych na terenie całego kraju. W swoich badaniach koncentrowałam się na przeprowadzeniu dokładnej charakterystyki fenotypowej i genotypowej bakterii, a także badań epidemiologicznych, określających rozprzestrzenienie się *Y. ruckeri* w polskich hodowlach ryb łososiowatych. Charakterystyka fenotypowa zgromadzonych izolatów wykazała, że na terenie Polski dominują nieruchliwe bakterie. Ponadto, na podstawie różnic w profilach biochemicznych, dokonałam podziału zgromadzonych izolatów na dwa biotypy: biotyp 1 oraz biotyp 2, przy czym w obrębie biotypu 1 wyróżniłam dodatkowo dwie biogrupy: biogrupę 1 oraz 2. Przeprowadzając badania eksperymentalne na pstrągach i obserwując rozwój klasycznych objawów jersiniozy, wykazałam ponadto zależność pomiędzy przynależnością danego izolatu do określonego biotypu, a chorobotwórczością bakterii. Przeprowadzona przeze mnie charakterystyka genotypowa zgromadzonych izolatów wykonana z zastosowaniem ERIC-PCR wykazała wzajemne pokrewieństwo filogenetyczne badanych bakterii. Przeprowadzone badania posłużyły do wydania rekomendacji placówkom Zakładów Higieny Weterynaryjnej celem ujednoczenia diagnostyki jersiniozy w Polsce.

W celu określenia serotypów badanych bakterii wykorzystałam swoiste surowice poliklonalne, pozyskane od immunizowanych królików. Za pomocą testu aglutynacji wykazałam, że na terenie Polski występują trzy serotypy *Y. ruckerii*: O1, O5 i O7, przy czym do serotypu O1 należało przeszło 90% izolatów.

Określenie serotypów *Y. ruckeri* miało podstawowe znaczenie dla zainicjowania badań nad immunoprofilaktyką jersiniozy w Polsce. Rozpoczęłam więc pracę nad opracowaniem i wdrożeniem procedur skutecznych szczepień przeciwko ERM w gospodarstwach rybackich. Dostępna na rynku, komercyjna szczepionka przeciwko tej chorobie opracowana została w oparciu o jeden, włoski szczep należący do serotypu I. W większości przypadków ta stosowana przez hodowców w Polsce immunoprofilaktyka przynosiła dobre rezultaty. Jednak co raz częściej pojawiały się doniesienia o nieskuteczności szczepionki komercyjnej lub też jej niewielkiej i krótkotrwałej protekcji przeciwko jersiniozie. Nasze badania nad autoszczepionką obejmowały szereg doświadczeń przeprowadzonych na pstrągach, a także analiz wybranych parametrów odpowiedzi immunologicznej ryb, w tym reakcji związanych ze stresem oksydacyjnym oznaczanym w różnych tkankach i narządach ryb, po ich szczepieniu. Porównywano więc ochronne działanie dwóch szczepionek przeciwko homologicznemu i heterologicznemu szczepom *Yersinia ruckeri*, które poprzedzone zostały określeniem optymalnych warunków szczepienia, tj. dawki antygeny, czasu ekspozycji ryb na zawiesiny szczepionki. Kilka tygodni po szczepieniu ryby zostały podzielone na grupy doświadczalne, a następnie każdą z nich zakażano homologicznymi lub heterologicznymi szczepami *Y. ruckeri*. Względny procent przeżycia (RPS) po zakażeniu szczepami homologicznymi wahał się od 87% do 90,5%, podczas gdy dla szczepów heterologicznych wartości te były znacznie niższe i wynosiły od 33 do 67%. Wyniki jednoznacznie wskazywały, że szczepionki przygotowane w oparciu o szczepy *Y. ruckeri* pochodzące

z danego gospodarstwa i w nim stosowane gwarantują skuteczniejszą profilaktykę ryb przeciwko jersiniozie.

Badania laboratoryjne wykazały, że wolne rodniki są odpowiedzialne za indukcję zarówno humoralnej, jak i komórkowej odpowiedzi immunologicznej oraz zwiększają odporność ochronną przeciwko infekcji *Y. ruckeri*. Wyniki analiz sugerują również, że pstrągi tęczowe wykazują specyficzne tkankowo mechanizmy stresu oksydacyjnego wywołane szczepieniem przeciwko jersiniozie. Biomarkery stresu oksydacyjnego, np. zawartość modyfikowanych oksydacyjnie białek w skrzelach i wątrobie oraz poziom reaktywnych kwasów 2-tiobarbiturowych w skrzelach, a także całkowita zdolność antyoksydacyjna w wątrobie, były wrażliwe na szczepienie pstrąga przeciwko *Y. ruckeri*. Dlatego mogą być one stosowane jako biomarkery w ocenie toksyczności szczepionki. Z praktycznego punktu widzenia wyniki mogą być użyteczne w odniesieniu do badań nad infekcjami bakteryjnymi oraz opracowywania i aplikacji nowych szczepionek stosowanych dla ryb.

Wyniki wyżej opisanych badań zostały przedstawione w następujących publikacjach:

- Kozińska A., **Pękala A.**: Występowanie *Yersinia ruckeri* ryb łososiowatych w Polsce i fenotypowa charakterystyka izolatów. Med. Weter. 2004, 60, 880 - 882.
- **Pękala A.**, Kozińska A., Antychowicz J.: Serological variation among Polish isolates of *Yersinia ruckeri*. Bull Vet Inst Pulawy 2010, 54, 305 - 308.
- **Pękala A.**, Antychowicz J.: Jersinioza ryb łososiowatych – charakterystyka czynnika etiologicznego i metody jego identyfikacji. Med. Weter. 2010, 66 (5), 299 - 301.
- Pękala A., Antychowicz J.: Jersinioza ryb łososiowatych – epizootiologia choroby i metody jej zwalczania. Med. Weter. 2010, 66 (5), 374 - 377.
- Kozińska A., **Pękala A.**: Porównanie efektywności dwóch autoszczepionek przeciwko jersiniozie u pstrągów tęczowych (*Oncorhynchus mykiss*). Komunikaty Rybackie 2012, 5, 8 - 12.
- Tkachenko H., Grudniewska J., **Pękala A.**, Terech-Majewska E: Oxidative stress and antioxidant defence markers in muscle tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after vaccination against *Yersinia ruckeri*. J Vet Res 2016, 60, 25 - 33, doi: 10.1515/jvetres-2016-0005.
- Tkachenko H., Kurhaluk N., **Pękala A.**, Grudniewska J., Pajdak J., Schulz P., Terech-Majewska E.: Effects of vaccination against yersiniosis on oxidative stress biomarkers in the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J Comp Pathol 2016, 154, 58 - 123.
- Tkachenko H., Grudniewska J., **Pękala A.**, Paździor E.: Effects of vaccination against *Yersinia ruckeri* on oxidative stress biomarkers and liver and heart biochemistry in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Archives of Polish Fisheries 2016, 24, 33 - 46, doi: 10.1515/aopf-2016-0004.
- Tkachenko H., Grudniewska J., **Pękala A.**: Muscle biochemistry in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* following *Yersinia ruckeri* vaccination. Baltic Coastal Zone Journal of Ecology and Protection of the Coastline, 2016, 20, 137 - 159.
- Tkachenko H., Grudniewska J., **Pękala A.**: Effect of oral vaccination against *Yersinia ruckeri* on oxidative stress biomarkers in gills, liver and heart of rainbow

trout (*Oncorhynchus mykiss*). Baltic Coastal Zone. Journal of Ecology and Protection of the Coastline, 2017, 21, 109 - 128.

- Tkachenko H., Grudniewska J., **Pękala-Safińska A.**: Antioxidant defense in the cardiac tissue of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* immunized against *Yersinia ruckeri*. Słupskie Prace Biologiczne, 2017, 14: 187 - 206.

### Bakteryjna choroba nerek (BKD)

W ramach realizacji pracy statutowej zaangażowana byłam w opracowanie testu ELISA służącego detekcji *Renibacterium salmoninarum*, Gram-dodatniej bakterii wywołującej bakteryjną chorobę nerek (BKD) ryb łososiowatych. Na zakażenie tą bakterią najbardziej wrażliwe są pstrągi tęczowe, a straty w hodowlach mogą wynosić 40%, a nawet 80% obsady.

Przez wiele lat sytuacja epizootyczna w Polsce w odniesieniu do zakażeń *R. salmoninarum* nie była znana. Na taki stan rzeczy wpływ miała bez wątpienia diagnostyka choroby. Tradycyjna metoda hodowli bakterii *in vitro* jest trudna i czasochłonna, a ich wzrost na podłożach bakteriologicznych trwa od 3 do 7 tygodni, przy czym jest często zagłuszany przez rozwój innych bakterii lub grzybów. Dlatego też do wykrywania *R. salmoninarum* powszechnie stosowane są różne metody immunodiagnostyczne, w tym test ELISA polecany przez Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (O.I.E.) jako jedna z podstawowych metod szybkiej diagnostyki BKD.

Badania nad opracowaniem i walidacją testu ELISA były prowadzone przeze mnie w pierwszych latach pracy. W standaryzacji testu brałam pod uwagę czas i temperaturę opłaszczania płytek przeciwciałami oraz inkubacji antygeny, a także doбираłam odpowiednie stężenia koniugatu. Wartość diagnostyczną testu oceniałam na podstawie wyników badań 130 prób dodatnich i ujemnych oraz 60 prób terenowych, przy czym próby terenowe badane były jednocześnie komercyjnym testem K-Dtect oraz metodą hodowlaną. Badano również czułość i specyficzność testu ELISA. Wykazałam przydatność opracowanego testu ELISA do wykrywania zakażeń *R. salmoninarum* w narządach wewnętrznych ryb łososiowatych. Ustalono, że optymalnymi parametrami przy opłaszczaniu płytek jest ich inkubacja z przeciwciałami przez 24 godz. w temp. 4°C, poprzedzona 2-godziną preinkubacją w temp. pokojowej; 2-godzinna inkubacja antygeny w temp. pokojowej, a rozcieńczenie koniugatu należy wykonać w stosunku 1:2000. Poziom wykrywalności testu ELISA został ustalony w przedziale  $1 \times 10^4$  –  $5 \times 10^4$  komórek bakterii  $\text{ml}^{-1}$ . Nie wykazano reakcji krzyżowych testu z żadnym z 13 testowanych gatunków mikroorganizmów potencjalnie chorobotwórczych i najczęściej izolowanych od ryb. Dokładność metody wynosiła 96%, specyficzność diagnostyczna 97%, a czułość 96%. Badania 60 prób terenowych wykazały, że 19 z nich oznaczono jako dodatnie. Zgodność komercyjnego i opracowanego testu ELISA wynosiła 95%, natomiast opracowanego testu i metody hodowlanej 96%.

W ramach realizowanego w latach 2014-2018 programu wieloletniego „Ochrona zdrowia zwierząt i zdrowia publicznego. Ocena stanu występowania chorób zakaźnych zwierząt hodowlanych i wolno żyjących”, przeprowadzałam regularne badania ryb łososiowatych w kierunku wykrywania zakażeń *Renibacterium salmoninarum* testem ELISA. Na podstawie otrzymanych wyników badań wykazano, że w Polsce BKD występuje sporadycznie, nie stanowiąc poważnego zagrożenia epidemiologicznego. Dzięki

przeprowadzonym badaniom możliwa była ocena sytuacji epizootycznej w naszym kraju w odniesieniu do rozprzestrzenienia się *Renibacterium salmoninarum*. Wyniki te raportowane są co roku do Europejskiego Laboratorium Referencyjnego ds. chorób ryb.

Wyniki wyżej opisanych badań zostały przedstawione w następującej publikacji:

- Kozińska A., **Pękala A.**: Opracowanie i ocena testu ELISA do wykrywania *Renibacterium salmoninarum* u ryb łososiowatych. Med. Weter. 2005, 61, 687 - 690.
- **Pękala-Safińska A.**: Patologia schorzeń nerek ryb łososiowatych – bakteryjna i przerostowa choroba nerek”. XLII Szkoleniu-Konferencji Hodowców Ryb Łososiowatych, 5- 6.10.2017, Gdynia, 134 - 145.

#### Badania nad strukturą lipopolisacharydu (LPS) bakterii *Aeromonas*

Ważnym etapem mojej pracy zawodowej była współpraca naukowa z Zakładem Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Celem wspólnie przeprowadzonych badań była charakterystyka lipopolisacharydu (LPS) bakterii *Aeromonas*, wysoce immunoreaktywnego związku powierzchniowego komórki, który zaliczany jest do czynników wirulencji i odgrywa znaczącą rolę w patogenezie mezofilnych i wykazujących zdolność ruchu bakterii *Aeromonas*. Do moich zadań w ramach realizowanego projektu należało przeprowadzenie fenotypowej charakterystyki wybranych izolatów *Aeromonas* spp. na podstawie ich profili biochemicznych. Następnie, bakterie te klasyfikowałam do odpowiednich gatunków. W tym celu izolowałam całkowite DNA bakterii, które następnie wykorzystywałam do przeprowadzenia klasycznego PCR. Otrzymane produkty reakcji używałam do wykonania analizy metodą PCR-RFLP. Gatunek bakterii *Aeromonas* określałam interpretując uzyskane wyniki badań.

W kolejnym etapie projektu oznaczałam serotypy wybranych izolatów bakterii *Aeromonas* metodą aglutynacji płytkowej. W tym celu immunizowałam króliki referencyjnymi szczepami bakterii *Aeromonas*, a następnie pozyskiwałam od nich swoistą surowicę poliklonalną. Były one wykorzystywane zarówno do przeprowadzenia testu aglutynacji, celem określenia serotypu bakterii, jak również do metody immunoblott. Te ostatnie analizy, jak również izolacja LPS, SDS-PAGE oraz analiza oparta o spektrometrię mas, wykonywane zostały w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii UMCS w Lublinie oraz u współpracowników naukowych.

Wyniki wyżej opisanych badań zostały przedstawione w następujących publikacjach:

- Turska-Szewczuk A., Lindner B., **Pękala A.**, Palusińska-Szys M., Choma A., Russa R., Holst O.: Structural analysis of the O-specific polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Aeromonas veroni* bv. *sobria* strain K49. Carbohydr Res 2012, 353, 62 - 68.
- Turska-Szewczuk A., Lindner B., Komaniecka I., Kozińska A., **Pękala A.**, Choma A., Holst O.: Structural and immunochemical studies of the lipopolysaccharide from the fish pathogen, *Aeromonas bestiarum* strain K296, serotype O18. Mar Drugs 2013, 11, 1235 - 1255, doi. 10.3390/md11041235.
- Turska-Szewczuk A., Duda K. A., Schwudke D., **Pękala A.**, Kozinska A., Holst O.: Structural studies of the lipopolysaccharide from the fish pathogen *Aeromonas*

*veronii* strain Bs19, serotype O16. Mar Drugs 2014, 12, 1298 - 1316; doi:10.3390/md12031298.

- Turska-Szewczuk A., Pietras H., Duda K. A., Schwudke D., Kozińska A., **Pękala A.**, Holst O.: Structure of the O-specific polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Aeromonas sobria* strain Pt312. Carbohydr Res 2015, 403, 142 - 148, doi: 10.1016/j.carres.2014.06.011.
- Pakiet K., Turska-Szewczuk A., Karas M. A., **Pękala A.**, Pietras H.: Structure of the O-specific polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Aeromonas hydrophila* strain K691 containing 4-acetamido-4,6-dideoxy-d-glucose. Carbohydr Res 2017, 439, 23 - 29.

### Zakaźny zespół owrzodzenia (EUS)

W swojej aktywności naukowej zajęłam się równoległe zakaźnym zespołem owrzodzenia (ang.: EUS - epizootic ulcerative syndrome), jednostką chorobową wymienioną zarówno w dokumentach Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (O.I.E.), jak też aktach prawnych Unii Europejskiej, m. in. dyrektywie Rady 2006/88/WE. EUS jest sezonową, endemiczną jednostką chorobową, diagnozowaną w różnych krajach na 5 kontynentach (Ameryka Północna i Południowa, Afryka, Azja i Australia), której czynnikiem etiologicznym jest grzyb *Aphanomyces invadans* (synonim *A. piscicida*). Zmiany chorobowe wywołane przez ten patogen doprowadzają zwykle do śnięć ryb, a śmiertelność przekracza 50% obsady. Na inwazję wrażliwych jest około 94 gatunków ryb, zarówno wolno żyjących jak i hodowlanych, zamieszkujących wody słodkie oraz estuaria. Swobodne przekraczanie granic oraz praktycznie nieograniczone możliwości transportu spowodowały, że problem introdukcji EUS do Europy, w tym także do Polski, może być jak najbardziej realny. Sprzyja temu wzmożony import ryb ozdobnych, szczególnie sprowadzonych z ich naturalnego środowiska. Z dostępnej literatury wiadomym jest, że w naszym kraju występują gatunki ryb, u których można obserwować rozwój klinicznej postaci EUS. Należą do nich karaś złocisty (*Carassius auratus auratus*), pstrąg tęczowy (*Oncorhynchus mykiss*) oraz ryby z rodziny sumowatych (*Siluridae*). W przypadku ryb akwariowych wymieniłem należy gurami dwupłame (*Trichogaster trichopterus*).

Celem przeprowadzonych przeze mnie badań była próba izolacji grzyba *A. invadans* od ryb ozdobnych wykazujących objawy kliniczne przypominające EUS. Materiał pobrałam od 453 ryb ozdobnych należących do 13 gatunków, pochodzących ze sklepów akwarystycznych z terenu Polski oraz od ryby pozyskanych bezpośrednio z importu z Azji, Afryki oraz Ameryki Południowej. Badania przeprowadzałam dwukierunkowo. Fragmenty tkanek i narządów posiewałam na podłoże GP, a następnie inkubowałam je w zalecanych warunkach przez odpowiedni okres celem izolacji grzyba *A. invadans*. Równocześnie, z pobranych tkanek wykonywałam diagnostykę EUS techniką PCR. W przebadanych próbkach nie wykryto grzyba *A. invadans*. W związku z tym uznano, że w Polsce nie występuje zakaźny zespół owrzodzenia (EUS).

Wyniki wyżej opisanych badań zostały przedstawione w następującej publikacji:



- **Pękala A.**, Paździor E., Kozińska A., Dragan M., Suszyński M., Niemczuk W., Reichert M.: Badania nad występowaniem zakaźnego zespołu owrzodzenia (EUS) u ryb ozdobnych w Polsce. *Med. Weter.* 2013, 69, 692 - 695.

### Choroby mięczaków

W 2003 roku, przed akcesją Polski do struktur państw Unii Europejskiej, zostałam zobligowana do utworzenia Krajowego Laboratorium Referencyjnego ds. chorób mięczaków. Zakres mojej nowej aktywności badawczej obejmował opracowanie i wdrożenie do stosowania metod diagnostyki zarówno egzotycznych (perkinsoza, mikrocytoza, bonamioza wywołana przez *Bomania exitiosa*), jak i nieegzotycznych (marteilioza oraz bonamioza wywołana przez *Bonamia ostreae*) jednostek chorobowych mięczaków. Po opracowaniu i zwalidowaniu procedur badawczych, rozpoczęłam coroczny monitoring stanu zdrowotnego dzikich populacji omułek jadalnych (*Mytilus edulis*) występujących w Morzu Bałtyckim. Jednak prawdopodobieństwo wystąpienia zarówno egzotycznych, jak i nieegzotycznych chorób mięczaków w polskiej strefie brzegowej Morza Bałtyckiego jest znikome. Spowodowane jest to warunkami klimatycznymi, w tym zbyt niskimi temperaturami wody oraz jej zasoleniem. W związku z tym nie jest możliwa komercyjna hodowla mięczaków w Morzu Bałtyckim.

Omułek jadalny (*Mytilus edulis*) może być nosicielem pasożyta *Marteilia refringens*, wywołującego marteiliozę, jednostkę chorobową zwalczaną z urzędu. Monitoring prowadzony wśród dzikich populacji omułek w polskiej strefie brzegowej opiera się głównie na badaniu właśnie tego pasożyta. Każdego roku, w sierpniu mięczaki są odławiane i przesyłane do Zakładu Chorób Ryb PIWet-PIB celem wykonania badań laboratoryjnych. Od omułek pobiera się fragmenty tkanek, głównie gruczoły trawienne oraz skrzela, które wykorzystywane są do badań cytologicznych oraz analiz PCR. Wyniki uzyskanych przez lata badań monitoringowych w kierunku wykrywania obecności *Marteilia refringens* były ujemne. Są one każdego roku raportowane do Europejskiego Laboratorium Referencyjnego ds. chorób mięczaków.

Wyniki wyżej opisanych badań zostały przedstawione w następujących publikacjach:

- **Pękala A.**: Inwazja *Bonamia ostreae* u ostryg jadalnych. *Med. Weter.* 2007, 63, 519 - 521.
- **Pękala A.**, Paździor E.: Marteilioza ostryg – choroba inwazyjna mięczaków. *Med. Weter.* 2012, 68, 728 - 731.

### Pozostała tematyka badawcza

Podczas mojej pracy zawodowej zajmowałam się również zagadnieniami dotyczącymi ogólnego stanu zdrowia i kondycji ryb, zarówno hodowlanych jak i ozdobnych. Swoje obserwacje konsultowałam ze specjalistami w dziedzinie chorób ryb. Zwracaliśmy uwagę na zagrożenia ze strony inwazji pasożytów bytujących najczęściej na powłokach zewnętrznych ryb, tj. na skórze oraz skrzelach. Wśród wielu gatunków pasożytów należy wymienić te najgroźniejsze dla zdrowia zarówno ryb hodowlanych takich jak karpie i pstrągi, a także ryb ozdobnych. Są to:

- wiciowce z gatunków *Cryptobia branchialis* oraz *Ichthyobodo necator*,
- orzęski: kulorzęsek (*Ichthophthirius multifiliis*), gatunki rodzaju *Trichodina*, rodzaj *Chilodonella*, głównie *Chilodonella piscicicola* i *Chilodonella hexasticha*, liczne rodzaje typowych komensali np. *Epistylis* i *Apiosoma*,
- przywry monogenetyczne *Dactylogyrus*, *Gyrodactylus*, sporadycznie występujące przywry rodzaju *Diplozoon*,
- ameby w skrzelach ryb śródłądowych.

Analizując przypadki kliniczne zaburzeń zdrowotnych obserwowanych u ryb, zwracaliśmy uwagę na zależność pomiędzy niekorzystnymi czynnikami środowiskowymi, a masową inwazją pasożytów w skórze i skrzelach ryb. O ile formy pasożytnicze są zdolne do wywołania poważnych straty w całym cyklu produkcyjnym ryb, szczególnie w warunkach intensywnej ich hodowli, to w przypadku organizmów komensalnych zagadnienie to jest bardziej skomplikowane. Komensale żyją samodzielnie w wodzie silnie zanieczyszczonej związkami organicznymi, okresowo tylko kolonizując powłoki zewnętrzne ryb. Po poprawie właściwości fizyko-chemicznych w zbiorniku, w tym wzroście koncentracji tlenu, samoistnie opuszczają ryby. Niejednokrotnie jednak pozostają na powłokach zewnętrznych i mogą powodować poważne zaburzenia stanu zdrowia ryb.

W swojej aktywności zawodowej zwracałam uwagę na rolę stresu i czynników stresogennych w genezie zaburzeń zdrowotnych u ryb. Skomplikowane reakcje jakie zachodzą w organizmie ryby w odpowiedzi na niesprzyjające czynniki, mają na celu przystosowanie i przeżycie tych zwierząt w ekstremalnych warunkach. Jednak gdy reakcje te są zbyt intensywne, często powtarzane lub długotrwałe, stają się szkodliwe dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Tym samym jest on podatny na infekcje różnych gatunków bakterii oraz innych czynników zakaźnych.

We współpracy z Zakładem Farmakologii i Toksykologii PIWet-PIB uczestniczyłam w badaniach pozostałości metronidazolu (MNZ) w tkankach (mięśniach, skórze) oraz narządach (skrzelach, nerkach, wątrobie) pstrąga tęczowego. Do moich zadań należało przeprowadzenie części eksperymentalnej, polegające na aplikacji MNZ rybom doustnie wraz z karmą, w dawce 25 mg/kg masy ciała dziennie przez 7 dni. W pobranych do analiz tkankach i narządach oceniono stężenie leku oraz jego głównego metabolitu, hydroksymetronidazolu (MNZOH). Związki te oznaczane były techniką chromatografii połączonej ze spektrometrią mas LC-MS/MS. Przeprowadzone badania wykazały, że mertonidazol stanowi główną pozostałość w tkankach pstrągów tęczowych. Związek ten wykrywano w samych mięśniach, mięśniach z przylegającą skórą oraz skórze, na poziomie zbliżonym do limitu decyzyjnego (0,20 µg/kg), aż do 42 dni po podaniu leku. W nerkach, wątrobie i skrzelach MNZ był obecny do 28 dni po aplikacji. MNZOH był szybciej eliminowany z tkanek ryb, gdzie utrzymywał się w mięśniach do 21 dni po aplikacji. Analiza mięśni pstrągów bez skóry wykazała wyższe stężenia badanych związków, które jednocześnie utrzymywały się w nich przez dłuższy czas w porównaniu do mięśni ze skórą. W ten sposób wskazano, że sam mięsień może być bardziej odpowiedni do efektywnej kontroli pozostałości MNZ w pstrągu tęczowym.

Poniżej lista wybranych publikacji związanych z opisaną tematyką badawczą:

- Antychowicz J., **Pękala A.**: Pasożyty i komensale najczęściej stwierdzone w mikroskopowym badaniu skóry i skrzeli ryb śródłądowych – interpretacja badań parazytologicznych. *Życie Wet.* 2015, 90(1), 18 - 28.

- Antychowicz J., **Pękala A.**: Stres i zależne od stresu bakteryjne choroby ryb. *Życie Wet.* 2015, 90(7), 450 - 460.
- Antychowicz J., Barnat A., Kramer I., Głowacka H., **Pękala A.**: Pasożyty europejskich wolno żyjących ryb śródlądowych, ze szczególnym uwzględnieniem występujących w polskich jeziorach i rzekach. *Życie Wet.* 2016, 91(8), 549 - 560.
- Antychowicz J., **Pękala A.**, Kramer I.: Przyczyny strat w hodowli karpia i ich leczenie. *Życie Wet.* 2017, 93(3), 190 - 200.
- Antychowicz J., **Pękala A.**, Kramer I.: Pasożytnicze choroby ryb akwariowych. *Życie Wet.* 2017, 92(7), 497 - 508.
- Mitrowska K., **Pękala A.**, Posyniak A.: Tissue distribution and residue depletion of metronidazole in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Addit Contam A* 2015, 32(6), 841 -848, doi: 10.1080/19440049.2015.1036320.

**6. Podsumowanie dorobku naukowego** (Szczegółowy wykaz prac naukowych oraz informacji o osiągnięciach dydaktycznych, wykonywanych recenzjach, współpracy naukowej i popularyzacji nauki znajduje się w załączniku nr 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego)

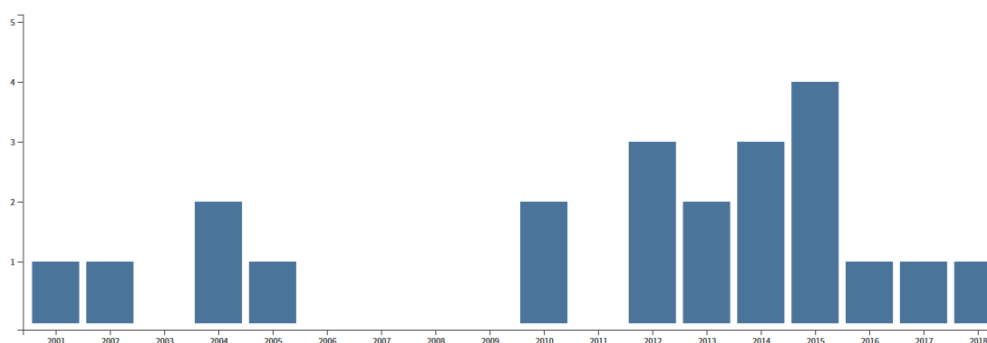
**6a) Zestawienie dorobku naukowego**

|  |               |
|--|---------------|
| Liczba publikacji w czasopismach z listy JCR                                   | <b>28</b>     |
| - w tym: opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora                           | <b>21</b>     |
| - w tym: stanowiących osiągnięcie habilitacyjne                                | <b>5</b>      |
| Liczba publikacji w czasopismach spoza listy JCR oraz autorstwa w monografiach | <b>46</b>     |
| Liczba książek oraz autorstwo w rozdziałach książek                            | <b>2</b>      |
| Liczba komunikatów konferencyjnych   | <b>35</b>     |
| Sumaryczny współczynnik wpływu (Impact Factor, IF)                             | <b>28,398</b> |
| - w tym: dla publikacji po uzyskaniu stopnia doktora                           | <b>26,761</b> |
| - w tym: dla publikacji stanowiących osiągnięcie habilitacyjne                 | <b>7,521</b>  |
| Suma punktów MNiSW   | <b>603</b>    |
| - w tym: dla publikacji po uzyskaniu stopnia doktora                           | <b>498</b>    |
| - w tym: dla publikacji stanowiących osiągnięcie habilitacyjne                 | <b>135</b>    |
| Liczba cytowani wg. Web of Science Core Collection                             | <b>86</b>     |
| - w tym: bez autocytoowań  | <b>76</b>     |
| Indeks Hirscha wg. Web of Science Core Collection                              | <b>5</b>      |

## Zestawienie liczby publikacji w poszczególnych czasopismach z lity JCR

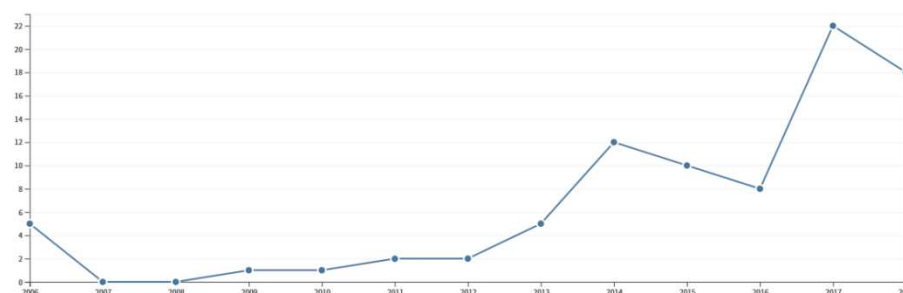
| Czasopismo  | Liczba publikacji<br>(w tym jako pierwszy autor) |
|---|--|
| Medycyna Weterynaryjna  | <b>11 (5)</b>                                    |
| Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy/<br>Journal of Veterinary Research | <b>5 (2)</b>                                     |
| Carbohydrate Research   | <b>3</b>   |
| Marine Drugs  | <b>2</b>   |
| Journal of Fish Diseases  | <b>1 (1)</b>                                     |
| Aquaculture   | <b>1 (1)</b>                                     |
| Bulletin of the European Association of Fish Pathologists                         | <b>1</b>   |
| Food Additives & Contaminants: Part A   | <b>1</b>   |
| Journal of Comparative Pathology  | <b>1</b>   |
| Preventive Veterinary Medicine  | <b>1</b>   |
| The Scientific World Journal  | <b>1</b>   |
| Liczba publikacji razem (w tym jako pierwszy autor)                               | <b>28 (9)</b>                                    |

## Liczba publikacji w poszczególnych latach (Web of Science - Core Collection, z dn. 22.10.2018)



## Liczba cytacji w poszczególnych latach (Web of Science - Core Collection, z dn. 22.10.2018)

Sum of Times Cited per Year



## **6b) Udział w projektach badawczych**

### Międzynarodowych:

- Projekt badawczy: FP7 – KBBE.2013.1.3-05 – 613754: EFFORT - Ecology from farm to fork of microbial drug resistance and transmission, (2013 - 2018);
- Projekt badawczy: One Health European Joint Project (Project Number 773830; JRP01-AMR-1): IMPART - Improving phenotypic testing of AMR by development of sensitive screening assays for emerging resistances, and setting missing ECOFFs (2018 - 2019).

### Krajowych:

- Projekt badawczy NCN nr 2013/11/B/NZ7/01690: Inwazyjne gatunki żółwi jako zagrożenie dla środowiska naturalnego i źródło mikroflory patogennej dla ludzi i zwierząt, (2014 - 2018);
- Projekt badawczy Konsorcjum Naukowego KNOW „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność” nr UMO-KNOW2015/PIWet-PIB/LAB1/02/09: Opracowanie metod wykrywania i identyfikacji nowo izolowanych bakteryjnych czynników chorobowych ryb, (2015 - 2017);
- Projekt badawczy NCBiR nr DZP/BIOSTRATEG-II/392/2015: Bezpieczeństwo i jakość żywności pochodzenia morskiego w aspekcie zagrożeń zoonotycznych i toksykologicznych: ocena ryzyka, monitoring i przeciwdziałanie. „SeaQual”, (2016 - 2019);
- Projekt badawczy NCN nr 2015/19/N/NZ7/01687: Charakterystyka polskich izolatów *Shewanella putrefaciens* w aspekcie chorobotwórczości dla ryb słodkowodnych, (2016 - 2019).

## **6c) Nagrody za działalność naukową**

- Nagrody I, II i III stopnia przyznawane przez Dyrektora PIWet-PIB w konkursach na najlepszą publikację pracowników naukowych PIWet-PIB w kategorii prac oryginalnych (2001, 2004, 2015).
- Nagroda Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych za wybitną monografię z zakresu nauk weterynaryjnych: "Małże jako źródło zagrożeń biologicznych", wyd. PIW-PIB w Puławach, 2013.
- Nagroda na 40<sup>th</sup> Mycotoxin Workshop, 11-13.06.2018, Monachium, Niemcy za doniesienie: Pekala-Safinska A., Jedziniak P., Kycko A., Pazdzior E., Wiecek B., Panasiuk L., Cieplinski M., Kasprzak M.: Fungal infection of brown trout (*Salmo trutta* morpha *trutta*) – case study.

## **6d) Udział w sympozjach, konferencjach i kongresach naukowych**

### Międzynarodowych:

- Hygiene Alimentorum XXVII (2006, Słowacja);
- „Aktualne problem z zakresu ochrony zdrowia ryb i innych hydrobiontów”, Ukraińska Akademia Nauk Rolniczych, (2008, Ukraina);

- Doroczne spotkanie przedstawicieli Krajowych Laboratoriów Referencyjnych z zakresu chorób mięczaków (2003 - 2016, Francja; 2017, Irlandia);
- Doroczne spotkanie przedstawicieli Krajowych Laboratoriów Referencyjnych z zakresu chorób ryb (2011, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, Dania);
- Kongres Europejskiego Stowarzyszenia Weterynaryjnych Diagnostów Laboratoryjnych (EAVLD) (2016, Republika Czeska);
- World Aquaculture (2017, RPA);
- International Congress of Parasitology (ICOPA) (2018, Korea Południowa).

#### Krajowych:

- Konferencja: „Stan badań naukowych, jakości wód i praktyki rybackiej przed wejściem Polski do Unii Europejskiej (2003, Międzyzdroje);
- XXXV Sesja Naukowa Komitetu Nauk o Żywności Polskiej Akademii Nauk „Żywność aspekty technologiczne i prozdrowotne” (2004, Łódź);
- Kongres Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów (2004, Bydgoszcz);
- Kongresy Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych (2004, Warszawa; 2012, Wrocław; 2016, Lublin);
- Krajowe Konferencje – Szkolenia dla hodowców ryb łososiowatych (2006 - Sobieszewo; 2010 - Jastrzębia Góra; 2014 - Gdańsk; 2016 – 2017 - Gdynia);
- Krajowe Konferencje hodowców karpia - Szkolenie producentów ryb (2012, 2016 - Paprotnia; 2015, 2017 - Słok; Licheń Stary - 2018);
- Konferencje naukowe w PIWet-PIB Puławy (2007, 2009, 2011, 2014);
- Konferencja naukowa: „Choroby mięczaków i skorupiaków podlegające obowiązkowi zwalczania” (2011, Olsztyn);
- Kursy-konferencje „Stan rybactwa śródlądowego w Polsce” (2014, Ruda Różaniecka, Katowice; 2015, Tarnowska Wola);
- Konferencja: „Rybactwo 2013-2015. Zarządzanie zdrowiem ryb w gospodarstwie rybackim” (2015, Zakopane);
- Konferencja naukowa: „Ochrona zdrowia ryb w aspekcie jakości i bezpieczeństwa żywności” (2015, Olsztyn);
- Konferencja “Mięczaki – potencjalne źródło zagrożeń dla zdrowia konsumenta i nowe wyzwania w urzędowym nadzorze nad żywnością” (2017, Lublin);
- Konferencja naukowa: „Włośnica i inne odpokarmowe zoonozy pasożytnicze. Bezpieczeństwo i jakość żywności pochodzenia morskiego w aspekcie zagrożeń zoonotycznych i toksykologicznych: ocena ryzyka, monitoring i przeciwdziałanie” (2017, Białowieża);
- Ogólnopolska konferencja farmaceutyczna „Racjonalne stosowanie produktów leczniczych weterynaryjnych” (2018, Kołobrzeg).

#### **6e) Udział w komitetach naukowych i organizacyjnych konferencji naukowych**

Jako kierownik Sekcji ichtiopatologii PTNW, byłam współorganizatorem Krajowych Konferencji – Szkoleń Hodowców Karpia w 2017 oraz 2018 r.

#### **6f) Członkostwo w towarzystwach naukowych**

- Polskie Towarzystwo Nauk Weterynaryjnych;
- Polskie Towarzystwo Mikrobiologów;
- The European Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians;
- European Association of Fish Pathologists.

#### **6g) Działalność dydaktyczna i popularyzująca naukę**

Jestem zaangażowana w realizację Programu Wieloletniego "Ochrona zdrowia zwierząt i zdrowia publicznego - Choroby zakaźne zwierząt akwakultury objęte obowiązkiem zwalczania", dlatego też corocznie od 2014 roku, prowadzę szkolenia dla pracowników Inspekcji Weterynaryjnej z zakresu bakteryjnych chorób ryb.

Ponadto, od 2006 r. prowadzę wykłady na temat bakteryjnych chorób ryb oraz chorób mięczaków dla lekarzy weterynarii w Weterynaryjnym Centrum Kształcenia Podyplomowego (WCKP) w Puławach w ramach Specjalizacyjnego Studium Podyplomowego z dziedziny Choroby ryb, PIWet-PIB Puławy (2006, 2012, 2016). Wykłady takie prowadziłam również w SGGW w Warszawie w ramach Specjalizacyjnego Studium Podyplomowego z dziedziny Higiena Zwierząt Rzeźnych i Żywności Pochodzenia Zwierzęcego (2006, 2011, 2013, 2015, 2017) oraz Specjalizacyjnego Studium Podyplomowego z dziedziny Epizootiologia i Administracja Weterynaryjna, SGGW Warszawa (2016).

W ramach spotkań PTNW zostałam poproszona o prelekcję na temat chorób ryb w oddziale PTNW w Kielcach (2013).

Przez dwa lata (2013-2014) organizowałam i prowadziłam w Zakładzie Chorób Ryb PIWet-PIB Puławach szkolenia komercyjne dla lekarzy weterynarii z zakresu oceny stanu zdrowotnego ryb, przeprowadzania badań klinicznych, sekcyjnych, parazytologicznych oraz bakteriologicznych.

Corocznie biorę udział, a przez cztery lata (2009-2013), współorganizowałam kursokonferencje dla pracowników Zakładów Higieny Weterynaryjnej w ramach działań Krajowego Laboratorium Referencyjnego z zakresu chorób ryb.

#### **6h) Opieka naukowa w charakterze promotora pomocniczego**

Sprawuję opiekę naukową w charakterze promotora pomocniczego w otwartym przewodzie doktorskim mgr. inż. Ewa Paździor „Charakterystyk i określenie czynników chorobotwórczości *Shewanella putrefaciens* u ryb”. Przewód doktorski został otwarty w 2015 r. i jest w trakcie realizacji.

#### **6i) Odbyte staże, szkolenia i kursy naukowe**

- Staż dotyczący diagnostyki i kontroli chorób mięczaków - Laboratorium Referencyjne UE ds. chorób mięczaków, IFREMER, La Tremblade, Francja (2003, 2004, 2005, 2007, 2009, 2011, 2013, 2015, 2017).
- Staż dotyczący diagnostyki i kontroli chorób ryb - Laboratorium Referencyjne UE ds. chorób ryb, Danish Institute for Food and Veterinary Research (DTU), Dania (2006, 2012, 2014, 2016, 2018).

- Staż w zakresie diagnostyki bakteryjnych i pasożytniczych chorób ryb - Fish Diseases Research Unit of the University of the Veterinary Medicine, Hanower, Niemcy (2008).
- Szkolenie: „Inter-laboratory testing with regard to monitoring bacteriological and viral contamination of bivalve molluscs”, Europejskie Laboratorium Referencyjne ds. monitoringu skażeń bakteriologicznych i wirusologicznych mięczaków, CEFAS, Weymouth, Wielka Brytania (2003).
- Seminarium Epidemiologiczne DIPNET „Surveillance of aquatic animal diseases. Objectives and challenges to surveillance system design with special reference to demonstrating exchange of pathogens between wild and farmed populations”, Saragossa, Hiszpania (2006).
- Szkolenie „Analysis of the impact of Perkinsosis to the European Shellfish Industry” CETMAR, Vigo, Hiszpania (2006).
- Szkolenie „Auditor wewnętrzny i ekspert techniczny oceniający laboratoria” Polskie Centrum Badań i Certyfikacji, Warszawa (2008).
- Sympozjum „Caring for health and welfare of fish: A critical success factor for aquaculture” FVE, Bruksela, Belgia (2013).
- Szkolenie w ramach projektu transfer wiedzy i innowacji w zakresie żywności tradycyjnej *Traditional Food Network to improve the transfer of knowledge for innovation* (TRAFOON) pt. „Ochrona zdrowia ryb w aspekcie jakości i bezpieczeństwa żywności” Olsztyn (2015).
- Szkolenie dla osób wykonujących czynności związane z wykorzystaniem zwierząt do celów naukowych lub edukacyjnych, UP, Lublin (2016).

#### **6j) Recenzje publikacji w czasopismach naukowych (z listy JCR)**

Jestem autorką 37 recenzji prac złożonych do opublikowania w czasopismach naukowych z bazy JCR: *Polish Journal of Veterinary Sciences* (16, IF<sub>2017</sub>=0,697); *Bulletin of Veterinary Institute in Pulawy / Journal of Veterinary Research* (10, IF<sub>2016/201017</sub>=0,811); *Journal of Fish Diseases* (4, IF<sub>2016/201017</sub>=2,138); *Diseases of Aquatic Organisms* (2, IF<sub>2016/201017</sub>=1,549); *Journal of Medical Microbiology* (2, IF<sub>2016/201017</sub>=2,159); *Acta Ichthyologica et Piscatoria* (1, IF<sub>2016/201017</sub>=0,67); *Journal of Applied Microbiology* (1, IF<sub>2016/201017</sub>=2,019); *Medycyna Weterynaryjna* (1, IF<sub>2016/201017</sub>=0,161).

#### **6k) Inna działalność**

Od 2016 r. jestem kierownikiem Sekcji ichtiopatologii Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych.

W ramach działalności referencyjnej jestem odpowiedzialna za funkcjonowanie Krajowego Laboratorium Referencyjnego ds. chorób ryb w zakresie takich jednostek chorobowych jak wrzodzenia ryb łososiowatych, jersnioza, BKD, a także EUS. W ramach tej aktywności organizuję badania biegłości dla pracowni Zakładów Higieny Weterynaryjnej. Ponadto, jestem odpowiedzialna za funkcjonowanie Krajowego Laboratorium Referencyjnego z zakresu chorób mięczaków. Biorę również czynny udział w międzylaboratoryjnych badaniach biegłości z zakresu diagnostyki bakteryjnych chorób ryb



oraz chorób mięczaków, a także zakaźnego zespołu owrzodzenia (EUS), które organizowane są przez Europejskie Laboratoria Referencyjne.

W latach 2009-2014 byłam zastępcą kierownika Centralnego Punktu Przyjęć Próbek PIWet-PIB.

Od 2002 r. aktywnie uczestniczę w tworzeniu systemu zarządzania jakością w Zakładzie Chorób Ryb PIWet-PIB. Zostałam powołana na funkcję kierownika ds. technicznych w Zakładzie Chorób Ryb PIWet-PIB, a w 2008 r. auditora wewnętrznego. Jestem autorką 7 instrukcji, 6 procedur badawczych, w tym 3 akredytowanych.

Puławy, 22.10.2018

Agnieszka Boko-Safińska