

Prof. dr hab. Antonina Sopińska
Zakład Chorób Ryb i Biologii
Instytut Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
UP w Lublinie
20-033 Lublin, ul. Akademicka 12

Lublin, dn. 05.11.2019 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Ewy Paździor pt. „Charakterystyka i określenie czynników chorobotwórczości *Shewanella putrefaciens* u ryb” wykonanej pod kierunkiem dr hab. Dariusza Wasyla prof. nadzw. Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

Podstawą formalną wykonania niniejszej recenzji jest Uchwała Rady Naukowej PIWet-PIB w Puławach z dnia 25.11.2015 r.

Recenzowana rozprawa doktorska liczy 50 stron i obejmuje wprowadzenie, cel i zakres prac doświadczalnych, materiał i metody, omówienie wyników, wnioski i obserwacje, streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe oraz dokumentację uzupełniającą do opublikowanych prac, w której doktorantka dołączyła fotografie obrazujące objawy chorobowe obserwowane u ryb oraz wybrane elementy diagnostyki szewanellozy. Ponadto doktorantka dołączyła oświadczenia współautorów o charakterze i zakresie ich udziału w poszczególnych pracach.

W skład jednotematycznego cyklu wchodzi trzy prace opublikowane w 2019 r. w czasopiśmie indeksowanym w Journal Citation Reports:

1. Paździor E.: *Shewanella putrefaciens* – a new opportunistic pathogen of freshwater fish, Journal of Veterinary Research 2016, 60, 429-434.
2. Paździor E., Pękala-Safińska A., Wasyl D.: Phenotypic diversity and potential virulence factors of the *Shewanella putrefaciens* group isolated from freshwater fish, Journal of Veterinary Research 2019, 63, 321-332.
3. Paździor E., Pękala-Safińska A., Wasyl D.: Genotypic diversity among *Shewanella* spp. collected from freshwater fish, Journal of Veterinary Research 2019, 42, 677-684.

Łączny IF prezentowanych prac wynosi 3,295 a liczba punktów MNiSW - 70. Wszystkie publikacje zostały opublikowane w języku angielskim i stanowią prace oryginalne prezentujące wyniki badań własnych. W pierwszej pracy doktorantka jest jedynym autorem, w dwóch

następnych, wieloautorskich, jest pierwszym autorem. Procentowy udział w powstawaniu publikacji wynosił odpowiednio: 100%, 75 % i 75% i polegał na opracowaniu koncepcji prac, wykonaniu badań eksperymentalnych, analizie i interpretacji wyników, przeglądzie literatury, przygotowywaniu manuskryptów i dokonaniu korekt po recenzjach. Potwierdza to dużą samodzielność i zaangażowanie doktorantki w wykonywaniu badań i prezentacji uzyskanych wyników.

Układ doświadczeń został podzielony w sposób logiczny na 4 etapy:

1. pozyskanie terenowych izolatów *S. putrefaciens* od ryb słodkowodnych w Polsce (praca 1 i 2)
2. szczegółową charakterystykę fenotypową izolatów *S. putrefaciens* oraz wykazanie zależności pomiędzy określonymi właściwościami tych bakterii a ich patogennością dla karpia i pstrągów (praca 1 i 2)
3. określenie chorobotwórczości bakterii z grupy *S. putrefaciens* poprzez eksperymentalne zakażenie karpia i pstrągów tęczowych (praca 2)
4. badania genotypowe izolatów *S. putrefaciens* obejmujące identyfikację molekularną oraz analizę filogenetyczną (praca 2, 3 i rozdz. 6)

Tematyka zagadnienia podjętego przez doktorantkę posiada zdecydowanie aktualny charakter ze względu na coraz większy udział bakterii z rodzaju *Shewanella* jako czynnika etiologicznego, będącego przyczyną szewanellozy, nowego problemu klinicznego, notowanego w Polsce od 2002 r. u ryb hodowlanych, a także dziko żyjących i ozdobnych, często o ciężkim a nawet śmiertelnym przebiegu. Objawy kliniczne choroby są zróżnicowane, często nie są charakterystyczne i niejednokrotnie podobne do zmian opisywanych w przebiegu dermatoz czy posocznicy, a jej przebieg uwarunkowany jest niedostatecznie znanymi czynnikami środowiskowymi. Dlatego też, podstawę rozpoznania warunkującego skuteczne leczenie są podstawowe badania laboratoryjne, a w ostatnich latach na znaczeniu zyskują badania molekularne. Duża heterogenność w obrębie rodzaju, a także poszczególnych gatunków *Shewanella*, nieznanne właściwości chorobotwórcze, zakres naturalnej oporności na powszechnie stosowane leki, czynią tę grupę bakterii niezwykle trudnym wyzwaniem diagnostycznym wymagającym zastosowania więcej niż jednej metody badawczej. W przedstawionej rozprawie doktorskiej Pani mgr Ewy Paździor podjęła się badań charakteryzujących fenotypowe i genotypowe właściwości izolatów *Shewanella putrefaciens*

pozyskanych od ryb słodkowodnych, a także starała się wykazać zależności pomiędzy określonymi właściwościami tych bakterii a ich patogennością dla karpia i pstrągów. Zaletą prezentowanych badań było przeprowadzenie analizy w oparciu o izolaty kliniczne. Doktorantka wraz z zespołem pracowników Zakładu Chorób Ryb PIWet-PIB w latach 2007-2016 pozyskała od ryb słodkowodnych 160 izolatów *Shewanella putrefaciens*. Do badań na potrzeby pracy doktorskiej wyselekcjonowała 51 izolatów, z których: 33 pochodziło od ryb hodowlanych (głównie od karpia pospolitego i pstrąga tęczowego), 12 od ryb dziko żyjących (amura białego, troci, tołpygi białej, siei pospolitej, jazia oraz płoci), 6 od ryb akwariowych (koi karpia, danio pręgowanego i barwnika szmaragdowego). W pracy zostały użyte referencyjne szczepy reprezentujące różne gatunki *Shewanella*: *S. putrefaciens*, *S. xiamenensis* i *S. oneidensis*.

W pracy pierwszej, doktorantka przedstawiła taksonomię, występowanie oraz najważniejsze właściwości bakterii *S. putrefaciens*. Pracą tą Pani Ewa Paździor znacząco uzupełniła stan wiedzy na temat występowania zakażeń ryb bakteriami z rodzaju *Shewanella* u ryb słodkowodnych w Polsce. Na podkreślenie zasługuje nie tylko przeprowadzenie pracochłonnych badań mikrobiologicznych na dużym materiale dającym możliwość rzetelnej oceny sytuacji epizootycznej w Polsce, ale również wykazanie zależności pomiędzy określonymi właściwościami tych bakterii a ich patogennością dla karpia i pstrągów. Doktorantka wykazała, że intensywność objawów chorobowych oraz śnięcia ryb uzależnione były od izolatu *Shewanella* jak również od czynników środowiskowych, z których szczególną rolę odgrywała temperatura wody. Doktorantka zaobserwowała, że temperatura wody w zakresie 7°C do 10°C predysponuje do zaburzeń zdrowotnych powodowanych przez bakterie z grupy *Shewanella* a choroba najczęściej występuje w okresie wczesnej wiosny.

Z pewnością warto podkreślić, iż badania doktorantki miały wielokierunkowy charakter a ich podstawą były trudności związane z prawidłową identyfikacją w oparciu o właściwości fenotypowe izolatów (praca 2). Doktorantka wykazała słaby potencjał dyskryminacyjny klasycznych testów typu API, wymagający zastosowania innych dodatkowych metod identyfikacji.

Do oryginalnych osiągnięć przedstawionych w pracy drugiej należy:

1. wykazanie w oparciu o sekwencjonowanie fragmentu genu 16S rRNA że bakterie wstępnie zidentyfikowane jako *S. putrefaciens* należą do 3 gatunków *S. putrefaciens*, *S. xiamenensis* i *S. oneidensis*
2. zbadanie podstawowych mechanizmów chorobotwórczości *Shewanella putrefaciens*:
 - zdolności przylegania do tkanek zakażonego organizmu

- produkcji enzymów
 - właściwości serologicznych
3. wykazanie, że bakterie z grupy *Shewanella* są naturalnie odporne na sulfonamidy a wrażliwe na fenikole

Naturalną konsekwencją uzyskanych wyników było podjęcie przez Doktorantkę badań określających chorobotwórczość bakterii grupy *Shewanella putrefaciens* poprzez eksperymentalne zakażenie wybranymi izolatami dwóch gatunków ryb: karpia pospolitych oraz pstrągów tęczowych (praca 2). Doktorantka potwierdziła, że identyfikowane gatunki z rodzaju *Shewanella* wykazały chorobotwórczość dla ryb, natomiast obserwowane różnice nasilenie objawów chorobowych i poziom śmiertelności były zależne od gatunku ryby. Stwierdziła również mniejszą patogenność gatunku *S. oneidensis* oraz *S. xiamenensis* niż *S. putrefaciens* zarówno u karpia i pstrągów. Wykazała, że izolaty z *S. putrefaciens* reprezentujące warianty serologiczne I i II można uznać za patogenne dla karpia i pstrągów, natomiast inne warianty serologiczne muszą być skorelowane z gatunkiem ryb np. III, VII, VIII i X nie powodowały żadnych objawów klinicznych u pstrągów w przeciwieństwie do karpia.

Dla pełnej, kompleksowej charakterystyki bakterii należących do *S. putrefaciens* Doktorantka przeprowadziła analizę konserwatywnego fragmentu genu 16S rRNA (praca 2 i 3). Badania molekularne wykazały, że izolaty zakwalifikowane wstępnie do grupy *S. putrefaciens* należą do *S. putrefaciens*, *S. oneidensis* oraz *S. xiamenensis*. Doktorantka stwierdziła podobieństwo pomiędzy izolatami *S. oneidensis* i *S. xiamenensis*, dowiodła również przydatność metody ERIC-PCR w identyfikacji *Shewanella* do poziomu gatunku, a przede wszystkim możliwość jej zastosowania w badaniach w ognisku epidemiologicznym szewanellozy w celu ustalenia źródła i drogi szerzenia się zarazki. Wykazała również, że metoda PFGE nie znajduje zastosowania do genotypowania izolatów *Shewanella*.

W oparciu o wyniki i wnioski z przeprowadzonych badań opublikowanych w cyklu publikacji rozprawy doktorskiej doktorantka zastosowała najnowszą dostępną metodę genotypowania, tj. sekwencjonowania genomowego (WGS) opisaną w rozdziale 6, pt. „Kierunki dalszych badań”. Na podstawie analizy sekwencji genomowych opartej na polimorfizmie pojedynczych nukleotydów (SNP) potwierdziła klasyfikację bakterii do gatunków *S. oneidensis* oraz *S. xiamenensis* uzyskaną w pracy na podstawie sekwencjonowania genu 16S rRNA. Wykazała, że izolaty identyfikowane jako *S. putrefaciens* wykazały większe powinowactwo genomu do gatunku *S. baltica* niż do *S. putrefaciens*. Ta obserwacja wskazuje, że bakterie te mogą stanowić nowy gatunek lub podgatunek *S. baltica*. Wykazała również w analizowanych genomach, głównie izolatów *S. xiamenensis*, obecność potencjalnych genów

oporności na środki przeciwbakteryjne co jest zgodne z wynikami fenotypowymi uzyskanymi w ramach badań do pracy doktorskiej.

Należy podkreślić, że Doktorantka wykazała się dużą umiejętnością i właściwym skonstruowaniem rozdziału „Wnioski i obserwacje”. W oparciu o prawidłowo przeprowadzoną analizę wniosków zamieściła 8 obserwacji zgodnie z planowanym zakresem badań oraz 3 wnioski, które w sposób syntetyczny odpowiadają na postawione cele badań rozprawy doktorskiej.

Podsumowując uważam, że publikacje prezentowane jako rozprawa doktorska tworzą spójny cykl, w którym kolejne prace stanowią kontynuację i uzupełnienie poprzednich. Prace te prezentują wysoki poziom naukowy, opierają się na nowoczesnych metodach badawczych, posiadają aspekt naukowy - uzupełniają dotychczasową wiedzę dotyczącą charakterystyki i różnicowania bakterii z grupy *Shewanella*, a także mają charakter aplikacyjny, gdyż w znacznym stopniu przyczyniają się do doskonalenia diagnostyki szewanellozy u ryb.

W związku z powyższym jednoznacznie stwierdzam, iż recenzowana przeze mnie rozprawa doktorska Pani mgr Ewy Paździor pt. „Charakterystyka i określenie czynników chorobotwórczości *Shewanella putrefaciens* u ryb” odpowiada warunkom określonym w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2014 r. poz. 1852) i przedkładam Radzie Naukowej PIWet-PIB w Puławach wniosek o dopuszczenie mgr Ewy Paździor do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysokie walory naukowe i aplikacyjne uzyskanych wyników zwracam się do Rady Naukowej PIWet-PIB w Puławach o wyróżnienie pracy doktorskiej stosowną nagrodą.

Kierownik Zakładu Chorób Ryb i Ichtiologii
Antonina Sopińska
Prof. dr hab. Antonina Sopińska