



Prof. dr hab. Andrzej Koncicki
Katedra Chorób Ptaków
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

O C E N A

rozprawy doktorskiej **lek. wet. Piotra Falkowskiego** zatytułowanej

„Ocena sytuacji epizootycznej wybranych zarażeń pierwotniaczych w stadach reprodukcyjnych gęsi”

wykonanej w Katedrze Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Gawła i promotora pomocniczego – dr n. wet. Kamili Bobrek

Podstawę formalną do wykonania recenzji pracy doktorskiej lek. wet. Piotra Falkowskiego stanowi pismo przewodniczącego Rady Dyscypliny Weterynaria, prof. dr hab. Wojciecha Nizańskiego (MDDD0000.4101.6.2018) z dnia 28 lutego 2023 r., zgodnie z uchwałą Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską stanowi spójny tematycznie cykl trzech artykułów opublikowanych w czasopiśmie z listy JCR wraz z autoreferatem i oświadczeniami współautorów o ich wkładzie merytorycznym w powstanie publikacji, stanowiących podstawę postępowania o nadanie stopnia doktora nauk weterynaryjnych, który zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 roku „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789) może stanowić podstawę do uzyskania stopnia naukowego doktora przez lekarza weterynarii Piotra Falkowskiego.

Wprowadzenie

Spośród wielu pasożytów występujących u ptaków szczególnie niebezpieczny dla drobiu grzebiącego, zwłaszcza indyków i kur, jest wiciowiec *Histomonas meleagridis* wywołujący histomonozę. Natomiast w patologii drobiu wodnego ostatnio coraz więcej uwagi poświęca się inwazjom wywoływanym przez pierwotniaki należące do przedstawicieli rzędu *Trichomonadida*, zwłaszcza przez rzęsistki (wiciowce) z rodzaju *Tetratrichomonas* spp. oraz przez należące do rzędu *Blastocystida* pierwotniaki z rodzaju *Blastocystis* spp. Wiciowce te są szeroko rozpowszechnione na całym świecie i często bytują w organizmie ptaków i ssaków jako komensale lub powodując zakażenia bezobjawowe. Jednak niektóre typy tych pierwotniaków, charakteryzujące się większą chorobotwórczością, mogą wywoływać zachorowania o łagodnym przebiegu a nawet przebiegać w sposób nietypowy z uszkodzeniem wielu narządów, co ostatnio udokumentowano w licznych publikacjach. Ta niekorzystna sytuacja epizootyczna inwazji wymienionymi pierwotniakami spowodowana jest wprowadzaniem sukcesywnie, od 1990 roku w USA i od 1995 r. w krajach Unii Europejskiej,

zakazem profilaktycznego i terapeutycznego stosowania u drobiu, stosowanych do tego czasu, skutecznych chemioterapeutyków. Dotyczy to w szczególności preparatów zawierających pochodne nitroimidazoli (metronidazol, ronidazol, dimetridazol). Natomiast zakaz stosowania pochodnych nitrofuranów (nifursol) wprowadzono od 31 marca 2003 roku. Zakaz podawania tych substancji ptakom domowym wynika z ryzyka ich pozostałości w środkach spożywczych, co może stanowić zagrożenie dla zdrowia konsumentów. Zakaz ten sprawił jednak, że histomonozą i inwazje innymi wiciowcami stały się ponownie dużym problemem epizootycznym i klinicznym w wielu krajach. Nie można również zapominać, że wymienione pasożyty, z uwagi na ich charakter zoonotyczny, jak i antropozoonotyczny (pasożyty polikseniczne), stanowią zagrożenie dla zdrowia publicznego, a np. blastocystoza jest jedną z najbardziej rozpowszechnionych parazytoz wśród ludzi.

Do inwazji rzęsistków najczęściej dochodzi poprzez kontakt bezpośredni, na przykład u gołębi w wyniku karmienia treścią wola, czy u innych ptaków drogą wstępującą, w następstwie zasysania przez kloakę (cloacal drinking), jako konsekwencja występujących u ptaków ruchów antyperystaltycznych jelit ślepych. Jednak niektóre gatunki wiciowców mogą w sprzyjających warunkach przeżyć nawet kilka dni poza organizmem żywiciela. Możliwe są zatem inwazje środowiskowe, poprzez zanieczyszczoną pierwotniakami wodę i paszę, w których dużą rolę odgrywają bezobjawowi nosiciele. Stąd na przykład blastocystoza ludzi określana jest mianem „choroby brudnych rąk”, gdyż do zarażenia dochodzi w wyniku niezachowywania odpowiedniej higieny. Przebieg inwazji jest następstwem wielorakich zależności występujących między pasożytem a żywicielem i zależy od wielu czynników. Gatunki, których typowym miejscem lokalizacji jest jelito grube (u ptaków jelita ślepe), w większości wydają się niepatogenne lub mało patogenne, podczas gdy lokalizacja pozajelitowa rzęsistków często prowadzi do rozwoju choroby u żywiciela.

Przytoczone wyżej fakty i specyfika chowu gęsi, zwłaszcza stad gęsi reprodukcyjnych, które są użytkowane przez trzy lub cztery sezony reprodukcyjne, w różnych systemach chowu (ekstensywny, półintensywny, intensywny), sprzyja szerzeniu się inwazji wiciowców. Ponadto, gęsi korzystają z wybiegów, na których mają kontakt z dzikim ptactwem oraz niezwykle trudne jest utrzymanie na nich należytej higieny, stąd bioasekuracja nie jest wystarczającym środkiem zapobiegającym szerzeniu się inwazji wiciowców. Chciałbym dodać, że wymienione problemy wynikające z technologii chowu gęsi stad reprodukcyjnych bardzo dokładnie i trafnie Doktorant omówił we wstępie opracowania stanowiącego kompilację publikacji.

W tym miejscu pragnę podkreślić, że tematyka podjęta w ocenianej rozprawie doktorskiej zasługuje na szczególne uznanie, gdyż jest pierwszym tak kompleksowym opracowaniem w naszym kraju. Na podkreślenie zasługuje także fakt, że badania stanowiące przedmiot ocenianej rozprawy doktorskiej prowadził zespół lekarzy weterynarii awiopatologów, pod kierunkiem praktyka z dużym doświadczeniem klinicznym prof. dr hab. Andrzeja Gawła i promotora pomocniczego dr n. wet. Kamili Bobrek. Sprawia to, iż przedłożona do oceny rozprawa doktorska wpisuje się w nurt niezwykle ważnych dzisiaj zagadnień mających na celu z jednej strony ograniczanie chemioterapii a z drugiej - wykazanie jakie tego są konsekwencje epidemiologiczne. W związku z powyższym stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska dotyczy aktualnego i ważnego dla awiopatologów zagadnienia i to nie tylko ze względu na aspekt teoretyczny, ale przede wszystkim praktyczny. Autorowi ocenianej dysertacji zależało bowiem na określeniu ekstensywności inwazji *Tetratrichomonas* spp. i

Blastocystis spp. w stadach reprodukcyjnych gęsi, utrzymywanych zgodnie z obowiązującą technologią chowu, w których, ze względu na zakaz, nie stosowano profilaktycznie chemioterapeutyków.

Ogólna charakterystyka przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej

Oceniana rozprawa doktorska jest kompilacją dwóch oryginalnych prac i jednej stanowiącej opis przypadku (*Case Report*), opublikowanych w czasopismach z listy JCR w latach 2020 (jedna praca) i 2022 (dwie prace). Łączna liczba punktów MEiN za te publikacje (zgodnie z rokiem opublikowania) wynosi 270, a sumaryczny IF – 9,339. We wszystkich pracach Doktorant jest pierwszym autorem, ale w żadnej z nich nie jest autorem korespondencyjnym. Kopie tych prac opatrzone są krótką charakterystyką o typowym układzie dla pracy doktorskiej, na co składa się: strona tytułowa, spis treści, streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp (3 strony), wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską, założenia i cel pracy doktorskiej, metodyka badań (3 strony), omówienie wyników badań z dwiema tabelami obrazującymi prewalencję zarażeń *Tetratrichomonas* spp. i *Blastocystis* spp. u gęsi w trzech cyklach nieśnych, dwoma wykresami, które przedstawiają odsetek dodatnich próbek w kierunku badanych wiciowców w zależności od wielkości stada i ryciną drzewa filogenetycznego obrazującą pokrewieństwo własnego izolatu z klinicznego przypadku tetratrichomonozą z innymi rzęsistkami izolowanymi od ptaków (5 stron), pięć wniosków, 41 pozycji piśmiennictwa oraz oświadczenia współautorów o ich wkładzie w powstanie tych publikacji.

Ocena przedstawionej do recenzji kompilacji publikacji stanowiących spójny tematycznie cykl trzech artykułów

We **wstępie**, Doktorant krótko przedstawia informacje na temat udomowienia gęsi, wielkości pogłowia tych ptaków w naszym kraju i systemu chowu, który różni się od systemów utrzymania innych gatunków drobiu. Szczególnie zasadne jest zwrócenie uwagi na specyfikę chowu tych ptaków, zwłaszcza na fakt użytkowania stad gęsi reprodukcyjnych przez kilka sezonów oraz konieczność dostępu do wybiegów. Bowiem taki system chowu gęsi sprzyja zakażeniom różnymi patogenami, w tym inwazjom pasożytów. Dodatkowo, zakaz stosowania u drobiu pochodnych nitroimidazolu spowodował, że gęsi są szczególnie podatne na zakażenia wiciowcami. Stąd podjętą tematykę badań uważam za uzasadnioną i bardzo aktualną.

W kolejnym rozdziale zatytułowanym: **Założenia i cel pracy** Doktorant prawidłowo sformułował następujące trzy hipotezy badawcze:

- w oparciu o badania historyczne założono, że ekstensywność inwazji *Tetratrichomonas* spp. w analizowanych stadach gęsi reprodukcyjnych może być wysoka;
- zarówno *Tetratrichomonas* spp., jak i *Blastocystis* spp. są powszechnie uznawane jako organizmy warunkowo patogenne dla ptaków, więc spodziewana jest duża liczba zarażeń bezobjawowych;
- ze względu na brak dostępności skutecznej profilaktyki oraz specyficzny system utrzymania gęsi, ekstensywność wymienionych inwazji będzie dodatkowo skorelowana z wiekiem i wielkością stad w jakich są one utrzymywane.

Z hipotez tych wynika cel pracy, którym było określenie ekstensywności zarażeń *Tetratrichomonas* spp. i *Blastocystis* spp. w stadach reprodukcyjnych gęsi oraz ustalenie w jaki sposób wielkość stad i czasokres ich utrzymywania wpływa na rozwój inwazji. Cel ten osiągnięto poprzez realizację następujących zadań:

1. ocena występowania *Tetratrichomonas* spp. w stadach reprodukcyjnych gęsi, wpływ wieku oraz warunków utrzymania stad na rozwój inwazji pasożyta (wyniki tych badań opublikowano w pracy: Falkowski P., Liebhart D., Bobrek K., Gaweł A.: The prevalence of *Tetratrichomonas* spp. in reproductive geese flocks. *Avian Diseases*, 2020, 64(4), 547–551. <https://doi.org/10.1637/aviandiseases-D20-00042>. Impact Factor: 1,577, punkty MNiSW: 70).
2. ocenę występowania *Blastocystis* spp. w stadach reprodukcyjnych gęsi, wpływ wieku oraz warunków utrzymania stad na rozwój inwazji pasożyta (wyniki tych badań opublikowano w pracy: Falkowski P., Gaweł A., Bobrek K.: Prevalence of *Blastocystis* in Geese Reproductive Flocks. *Animals*, 2022, 12(3), 291. <https://doi.org/10.3390/ani12030291>. Impact Factor: 3.231, punkty MEiN: 100).
3. opis przypadku klinicznego tetratrichomonozji w stadzie reprodukcyjnym gęsi wraz z analizą filogenetyczną pozyskanego izolatu (wyniki tych badań opublikowano w pracy: Falkowski P., Gaweł A., Bobrek K.: Tetratrichomoniasis in the Geese Flock. (Case Report). *Pathogens*, 2022 11, 1219. <https://doi.org/10.3390/pathogens11111219>. Impact Factor: 4.531, punkty MEiN: 100).

Kolejny rozdział to **Metodyka badań**, w którym Doktorant informuje, że badania prowadzono w latach 2016 - 2019 w stadach gęsi utrzymywanych w pięciu województwach (lubuskie, dolnośląskie, wielkopolskie, mazowieckie i łódzkie). Materiał do badań stanowiło 989 wymazów z kloaki pobieranych losowo od 23 ptaków z każdego z 43 stad gęsi reprodukcyjnych rasy Gęś Biała Kołudzka. Gęsi przyporządkowano do trzech grup w zależności od liczby cykli produkcyjnych (pierwszy, drugi, trzeci) oraz na podstawie wielkości - do stad małych liczących do 1000 osobników, średnich – liczących 1001-2000 ptaków i dużych – liczących ponad 2000 ptaków. Wymazy od gęsi z każdego stada pobierano jednokrotnie. Ptaki były klinicznie zdrowe. Natomiast przypadek klinicznej tetratrichomonozji wystąpił u gęsi po drugim cyklu produkcyjnym. Choroba przebiegała z klasycznym włóknikowym zapaleniem jelit ślepych. Od ptaków z tego stada do badań pobrano wycinki wątroby i jelit ślepych wraz z treścią.

Wymazy bezpośrednio po pobraniu umieszczano w medium namnażającym i inkubowano przez 48 godz. w temperaturze 37°C. Dla potwierdzenia obecności pierwotniaków z każdej próbki sporządzano preparaty mikroskopowe, które oceniano przy użyciu mikroskopu świetlnego. Ponadto, każdą próbkę wirowano i z osadu izolowano materiał genetyczny przy użyciu komercyjnego zestawu kolumienkowego. Identyfikację izolowanego materiału genetycznego z próbek wątroby i jelit ślepych pobranych od gęsi z kliniczną formą tetratrichomonozji. Następnie wykonywano klasyczną reakcję PCR z użyciem specyficznych starterów dla *Tetratrichomonas gallinarum* i *Blastocystis* spp. Kontrolę pozytywną w przypadku *Tetratrichomonas gallinarum* stanowiło DNA pozyskane z hodowli klonalnej tego wiciowca od profesora Michaela Hessa z Uniwersytetu Medycyny Weterynaryjnej w Wiedniu a w

przypadku *Blastocystis* spp. – DNA z własnego izolatu, którego sekwencję umieszczono w GenBanku. Produkty amplifikacji sekwencjonowano w firmach zewnętrznych (Genomed i Macrogen Europe). Uzyskane odczyty badanych sekwencji edytowano, analizowano i składano przy użyciu oprogramowania Mega6 a następnie porównywano z sekwencjami dostępnymi w bazie GenBank by przypisać je do odpowiednich rodzajów i gatunków pierwotniaków. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu R, version 3.6.0, chociaż w kompilacji ocenianego doktoratu różnic statystycznych nie zaznaczono. Natomiast analizę filogenetyczną izolatu uzyskanego z klinicznego przypadku tetratrachomonozji wykonano na podstawie sekwencji uzyskanej przez połączenie fragmentu 18S rRNA i ITS.

W świetle powyższego stwierdzam, że Doktorant poprawnie zaplanował badania i wykonał je na dużym liczebnie materiale stosując tradycyjne metody mikroskopowe i nowatorskie metody biologii molekularnej.

W rozdziale **Omówienie wyników badań** Doktorant bardzo krótko odnosi się do uzyskanych wyników powołując się na poszczególne publikacje stanowiące kompilację. Godne uwagi jest wykazanie iż zarażenia gęsi stad reprodukcyjnych wiciowcami z rodzaju *Tetratrachomonas* są powszechne, gdyż odsetek zarażonych stad wynosił 88,4, przy prewalencji (ekstensywności) wynoszącej 43,47%. Przy czym wykazano iż prewalencja rośnie wraz z kolejnym cyklem nieśności (od 35,05% po pierwszym do 64,82% po trzecim cyklu nieśności) i była wyższa w stadach większych (od 40,6% w stadach małych do 82,6% w stadach dużych). Dowodzi to, iż ekstensywność inwazji tym wiciowcem w stadach reprodukcyjnych gęsi jest skorelowana z wiekiem ptaków i wielkością stada. Wynika z tego, że pomimo iż na ogół zarażenia wywołane *Tetratrachomonas gallinarum* u gęsi przebiegają subklinicznie, to jednak u ptaków starszych jest większe prawdopodobieństwo wystąpienia formy klinicznej choroby. Bez wątplenia sprzyja temu brak dostępnych chemioterapeutyków, jak i system chowu gęsi. Interesującym wynikiem badań było wykazanie iż czynnikiem etiologicznym klinicznego przypadku tetratrachomonozji był *Tetratrachomonas gallinarum*, tym samym nie potwierdzono wcześniejszych przypuszczeń, że u gęsi występuje odmienny gatunek tego pierwotniaka – *Tetratrachomonas anseris*. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt podjęcia badań dotyczących występowania zarażeń gęsi wiciowcem z rodzaju *Blastocystis* spp. i wykazanie iż zarówno prewalencja, jak i częstość zarażeń w porównaniu do *Tetratrachomonas* spp. była niższa. Wykazano bowiem, że 46,5% badanych stad było zarażonych przy ekstensywności zarażeń wynoszącej 7,48%. Ponadto, nie stwierdzono korelacji między zarażeniem a wielkością stada, chociaż ekstensywność inwazji rosła wraz z wiekiem ptaków. Nie mniej, mając na uwadze stosunkowo niską specyficzność obu badanych wiciowców wobec żywicieli, należy postrzegać gęsi jako potencjalne źródło zarażenia ludzi i zwierząt. Na podkreślenie zasługuje również wykazanie iż pomimo tak powszechnych zarażeń gęsi stad reprodukcyjnych badanymi wiciowcami, zwłaszcza *Tetratrachomonas* spp., nie wpływają one na parametry produkcyjne (nieśność, zapłodnienie, FCR). Ponadto, jak wynika z tabeli 2 zamieszczonej w pracy opublikowanej w Avian Diseases, zgodność wyników badania mikroskopowego próbek po inkubacji w kierunku *Tetratrachomonas* spp. w porównaniu z metodą PCR wynosiła ok. 96% (415 do 430/989 próbek dodatnich badanych odpowiednio metodą mikroskopową i PCR).

Wyciągnięte na podstawie przeprowadzonych badań **wnioski** w liczbie 5 są prawidłowe.

Recenzowaną rozprawę doktorską oceniam pozytywnie ze względu na jej następujące walory:

- stanowi ona pierwsze w kraju tak szczegółowe opracowanie naukowe dotyczące występowania zarażeń u gęsi stad reprodukcyjnych wiciowcami z rodzaju *Tetratrichomonas* i *Blastocystis*;
- badania zrealizowano z zastosowaniem tradycyjnej metody mikroskopowej i nowoczesnych metod badawczych, co podnosi ich wartość naukową;
- wiarygodność praktyczną uzyskanych wyników badań podnosi fakt ich wykonania na bardzo dużej liczbie gęsi w warunkach chowu fermowego oraz współpraca w realizacji założeń pracy z zespołem naukowców z Kliniki Medycyny Drobiu i Ryb Uniwersytetu Medycyny Weterynaryjnej w Wiedniu, którym kieruje prof. Michael Hess – autorytet w tym zakresie;
- wykazanie iż kliniczny przypadek tetratrichomonozы gęsi był wywołany przez *Tetratrichomonas gallinarum*;
- szczególnie istotne jest opublikowanie uzyskanych wyników badań w trzech pracach z listy JCR.

W mojej opinii rozprawa doktorska lek. wet. Piotra Falkowskiego, w postaci kompilacji trzech publikacji, stanowi bardzo wartościowe opracowanie naukowe dotyczące występowania u gęsi stad reprodukcyjnych pierwotniaków z rodzaju *Tetratrichomonas* i *Blastocystis*, które mogą stanowić źródło zarażenia ludzi i zwierząt. Cenne jest także wykazanie iż tetratrichomonozа gęsi w opisanym przypadku klinicznym była wywołana przez *Tetratrichomonas gallinarum*.

Pragnę także dodać, że jako dociekliwy recenzent nie dostrzegłem w przedłożonym do recenzji opracowaniu uchybień i niedociągnięć, na które mógłbym zwrócić uwagę Doktorantowi. Zawód recenzenta polega na dopatrzeniu się jedynie pojedynczych błędów literowych, które nie wpływają na jednoznacznie pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej.

W konkluzji wyrażam opinię, że rozprawa doktorska lek. wet. Piotra Falkowskiego pt. „Ocena sytuacji epizootycznej wybranych zarażeń pierwotniaczych w stadach reprodukcyjnych gęsi” odpowiada wymogom zawartym w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789), w związku z art. 179 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r., poz. 1669 ze zm.). Biorąc powyższe pod uwagę przedkładam Radzie Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie lek. wet. Piotra Falkowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



prof. dr hab. Andrzej Koncicki