

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

Olsztyn, 03.11.2022 r.

O C E N A

rozprawy doktorskiej **lek. wet. Ireneusza Sokoła** zatytułowanej

”Wpływ wczesnego podawania chemioterapeutyków na skład mikroflory grzybiczej przewodu pokarmowego indyków oraz charakterystyka fenotypowa wybranych izolatów”

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 Kamili Bobrek

Podstawę formalną do wykonania recenzji pracy doktorskiej lek. wet. Ireneusza Sokoła stanowi pismo przewodniczącego Rady Dyscypliny Weterynarii, prof. dr hab. Wojciecha Niżańskiego (MDDD000.4101.5.2018) z dnia 27 września 2022 r., zgodnie z uchwałą Rady Dyscypliny Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską stanowi spójny tematycznie cykl pięciu artykułów opublikowanych w czasopismach 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 Ireneusza Sokoła.

Wprowadzenie

Grzybice są stosunkowo rzadko występującymi chorobami drobiu, jednak z uwagi na przewlekły przebieg są zakażeniami wyniszczającymi gospodarza. Nie należą one do chorób zaraźliwych (z wyjątkiem dermatofitoz, które są zakaźnymi chorobami odzwierzęcymi) i pomimo, że niewiele gatunków grzybów należy do bezwzględnych patogenów, to jednak mogą one być przyczyną poważnych strat w produkcji drobiarskiej. Spośród grzybic najbardziej niebezpieczna w produkcji drobiarskiej jest aspergiloza. Inne grzybice ptaków, jak kandydiaza i dermatofitoza są mniej powszechnymi chorobami. Natomiast wymieniona dermatofitoza oraz jeszcze rzadziej występujące histoplazmoza i kryptokokoza stanowią znaczące zagrożenie dla zdrowia publicznego. Zakażenia grzybami z rodzaju *Aspergillus* na ogół dotyczą układu oddechowego, natomiast zakażenia grzybami z rodzaju *Candida* dotyczą zwykle przewodu pokarmowego.

Grzyby z rodzaju *Candida* występują na całym świecie i wchodzą w skład mikroflory przewodu pokarmowego zdrowych ludzi, zwierząt i ptaków. Stąd ich wyizolowanie nie dowodzi, iż mamy do czynienia z grzybicą przewodu pokarmowego. Kandidiaza jest oportunistyczną grzybicą endogenną, gdyż rozwój grzybów z rodzaju *Candida* jest na ogół konsekwencją zaburzeń mikroflory jelit na różnym tle, a nie ekspozycją na źródło zewnętrzne. Najczęstszą przyczyną zwiększonego namnażania się tych komensalicznych i oportunistycznych grzybów w przewodzie pokarmowym ptaków jest przedłużona lub w ogóle niewłaściwa terapia przeciwdrobnoustrojowa, która zaburza skład mikroflory przewodu pokarmowego. Zachwianie w ten sposób równowagi mikrobiologicznej jelit sprzyja intensywnemu namnażaniu się grzybów. Istotnym czynnikiem predysponującym może być także stan immunosupresji na różnym tle i młody wiek ptaków.

Występowanie kandidiazy u ptaków na ogół jest sporadyczne. Opisano jednak przypadki tej choroby u młodych indyków, gdzie śmiertelność sięgała 20%. Kandidiaza zwykle jest wywoływana przez drożdżaki z rodzaju *Candida albicans*, chociaż w 2000 r. we Włoszech opisano epidemię kandidiazy u 6-tygodniowych indyków na tle zakażenia *Candida rugosa*, przebiegającą ze śmiertelnością ponad 40%. Do wystąpienia tej choroby, w analizowanym przypadku, predysponowała długotrwała terapia antybiotykowa prowadząca do zaburzenia homeostazy jelit i immunosupresji.

W tym miejscu chciałbym podkreślić, że grzybica przewodu pokarmowego u drobiu, w tym szczególnie u indyków, może występować częściej niż sugerują to wyniki badań laboratoryjnych, co jest spowodowane brakiem ukierunkowania diagnostyki w tym kierunku. Chociaż z drugiej strony, z uwagi na fizjologiczne występowanie grzybów z rodzaju *Candida* w przewodzie pokarmowym ptaków, interpretacja uzyskanych wyników musi być ostrożna. Należy także dodać, że grzybice przewodu pokarmowego u drobiu generalnie rzadko budzą zainteresowanie badaczy, stąd 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 świetnego praktyka prof. dr hab. Andrzeja Gawła. Sprawia to, iż przedłożona do oceny rozprawa doktorska wpisuje się w nurt niezwykle ważnych dzisiaj zagadnień mających na celu ograniczanie antybiotykoterapii i narastania antybiooporności, gdyż jak wyżej zaznaczono, nadużywanie chemioterapii jest główną przyczyną zachwiania równowagi w biocenozie przewodu pokarmowego prowadzącą do rozwoju grzybów.

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. Dzisiaj bowiem dąży się do ograniczania antybiotykoterapii, a uzyskane wyniki badań mogą uzmysłwić lekarzom weterynarii wolnej praktyki, jakie są konsekwencje ich często nieuzasadnionego stosowania i nadużywania.

Ogólna charakterystyka przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej

Oceniana rozprawa doktorska stanowi kompilację pięciu publikacji, w tym jednej pracy przeglądowej i czterech oryginalnych, opublikowanych w latach 2015, 2017, 2018 i

2020. Łączna liczba punktów MNiSW (MEiN) za te publikacje (zgodnie z rokiem opublikowania) wynosi 140, a sumaryczny IF – 4,559. 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, wprowadzenie (4 strony), wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską, założenia i cel pracy doktorskiej, metodyka badań (3 strony), omówienie wyników badań (1,5 strony), pięć wniosków, 24 pozycje piśmiennictwa oraz oświadczenia współautorów o ich wkładzie w powstanie tych publikacji.

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

We **wstępie**, Doktorant moim zdaniem niepotrzebnie, z uwagi na brak związku z problematyką pracy, podaje informacje na temat pochodzenia indyków, wielkości produkcji mięsa indyczego w Polsce i krajach UE, czy opłacalności chowu tych ptaków. Należało natomiast bardziej skoncentrować się na roli grzybów z rodzaju *Candida* w etiopatogenezie kandydiazy, pomimo że informacje te częściowo są zawarte w pracy przeglądowej wchodzącej w skład kompilacji pt. „Kandydiaza u drobiu” opublikowanej w 2015 r. w Medycynie Weterynaryjnej. Ponadto, w tym rozdziale, na podstawie analizy literatury naukowej, Doktorant powinien szczegółowo uzasadnić podjętą tematykę badawczą.

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

- grzyby są częścią naturalnej mikroflory przewodu pokarmowego indyków;
- antybiotykoterapia we wczesnym okresie życia wpływa na zaburzenie mikrobiomu, a tym samym zwiększy się liczba grzybów w przewodzie pokarmowym indyków;
- ze względu na brak powszechnego stosowania środków przeciwgrzybiczych w produkcji drobiarskiej, izolaty pochodzące od indyków nie powinny być wielolekooporne;
- wśród wyizolowanych grzybów z przewodu pokarmowego indyków znajdą się szczepy *Candida albicans*, dla których określi się zdolność produkcji enzymów i profil genetyczny.

Z hipotez tych wynika cel pracy, którym była ocena wpływu wczesnego podawania chemioterapeutyków na skład flory grzybiczej przewodu pokarmowego indyków, określenie naturalnie występujących rodzajów grzybów w przewodzie pokarmowym indyków oraz charakterystyka wybranych izolatów. Cel ten osiągnięto poprzez realizację następujących zadań:

1. określenie częstości występowania grzybów w przewodzie pokarmowym zdrowych indyków w 5 tygodniu życia oraz ich identyfikacja gatunkowa (wyniki tych badań opublikowano w pracy: Sokół I., Gawel A., Bobrek K.: The prevalence of yeast and characteristics of the isolates from the digestive tract of clinically healthy turkeys. Avian Diseases, 2018, 62, 286–290. Impact Factor: 1,306, punkty MNiSW: 35).

2. ocenę zmian w składzie mykoflory piskląt indyckich po leczeniu określonymi grupami chemioterapeutyków w pierwszych dniach życia ptaków (wyniki tych badań opublikowano w pracy: Sokół I., Bobrek K., Gawel A., Tokarzewski S.: The effect of the administration of different antimicrobial formulations on the fungal infestation of the gastrointestinal tract in turkeys. *Pakistan Veterinary Journal*, 2017, 37, 475–479. Impact Factor: 1,217, punkty MNiSW: 30).

3. określenie lekooporności wybranych gatunków *Candida* oraz charakterystyka genotypowa i określenie czynników zjadliwości wybranych szczepów *Candida albicans* (wyniki tych badań opublikowano w pracach: Sokół I., Gawel A., Bobrek K.: Investigation of the correlation between virulence factors and genotypic profiles of *Candida albicans* isolated from turkeys. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2018, 21, 29–33. Impact Factor: 0,802, punkty MNiSW: 20 oraz Sokół I., Tokarzewski S., Bobrek K., Gawel A.: E-test determination of antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from turkeys. *Journal of Veterinary Research*, 2020, 64, 517–521. Impact Factor: 1,039, punkty MEiN: 40).

Kolejny rozdział to **Metodyka badań**, w którym Doktorant informuje, że badania prowadzono w latach 2014 - 2017 w 51 stadach indyków rzeźnych typu Big 6 (wydaje się, że Doktorant mylnie podaje, iż badania prowadzono w stadach hodowlanych indyków). Dla określenia fizjologicznego składu mikroflory przewodu pokarmowego od zdrowych 5-tygodniowych indyków, którym wcześniej nie aplikowano chemioterapeutyków, pobierano wymazy z jamy dziobowej, wola i kloaki. Muszę jednak stwierdzić, że Doktorant nie określał fizjologicznego składu mikroflory jelit, gdyż prowadził jedynie badania w kierunku obecności grzybów (patrz wyniki opublikowane w *Avian Diseases*). W dalszej części tego rozdziału Doktorant stwierdza, iż w stadach indyków, w których występowały w okresie okołolęgowym problemy zdrowotne na tle zakażeń bakteryjnych, od trzeciego dnia ich życia przez pięć dni stosowano „najpopularniejsze” chemioterapeutyki. Takie stwierdzenie w pracy naukowej nie powinno mieć miejsca. Zastosowanie specyfików należało poprzedzić badaniem bakteriologicznym i określeniem wrażliwości (antybiogram). Jest to o tyle istotne, że badano wpływ zaordynowanej terapii na występowanie grzybów w przewodzie pokarmowym, a w przypadku takiego postępowania nie wiadomo, jakie bakterie były przyczyną problemów zdrowotnych i czy w ogóle były wrażliwe na zastosowane antybiotyki. Wymazy z jamy dziobowej, wola i kloaki pobierano bezpośrednio po zakończonym leczeniu i później od ptaków w wieku 5 tygodni. Jak wynika z lektury wyników badań opublikowanych w *Pakistan Veterinary Journal* wczesne leczenie przeciwdrobnoustrojowe, zwłaszcza antybiotykami beta-laktamowymi, silnie predysponuje przewód pokarmowy do kolonizacji zwłaszcza grzybami z rodzaju *Candida* i *Trichosporon*. Warte podkreślenia jest jednak to, że u żadnego z badanych ptaków nie stwierdzono klinicznej formy kandydiazy.

Do zrealizowania założeń rozprawy prowadzono izolację i identyfikację grzybów z zastosowaniem klasycznych metod mikrobiologicznych. Przynależność gatunkową grzybów określano metodami molekularnymi a produkty PCR sekwencjonowano przy użyciu określonych starterów w firmach zewnętrznych (Genomed, Macrogen Europe). Ponadto dokonano charakterystyki genotypowej wyizolowanych grzybów *Candida albicans* i oceniono korelację pomiędzy ich profilem genotypowym a czynnikami wirulencji określając

na odpowiednio wzbogaconych podłożach obecność proteinazy, fosforylasy i hemolizyny. Określono w ten sposób cztery profile genotypowe oraz trzy profile enzymatyczne i wykazano iż profile genotypowe są ściśle skorelowane z profilami enzymatycznymi. Ponadto 52 izolaty *Candida* spp. oceniono metodą E-testu pod względem wrażliwości na specyfiki przeciwgrzybicze – amfoterycynę B, flukonazol, itraconazol i worykonazol. Wykazano, że izolaty tego grzyba są wrażliwe na badane specyfiki z wyjątkiem itraconazolu, w odniesieniu do którego oporność sięgała 23,1%, a *Candida krusei* była jedynym izolatem opornym na amfoterycynę B, flukonazol i itraconazol. Natomiast wszystkie izolaty były wrażliwe na worykonazol.

Uzyskane wyniki poddawano analizie z użyciem odpowiednich oprogramowań (Mega 6 i Quantity One) i analizie statystycznej przy użyciu oprogramowania Statistica 12 Software.

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

W rozdziale **Omówienie wyników badań** Doktorant bardzo krótko odnosi się do uzyskanych wyników powołując się na poszczególne prace oryginalne stanowiące kompilację. Godne uwagi jest wykazanie iż zaledwie u 12,4% zdrowych indyków wykazano wzrost grzybów. Dowodzi to, iż nie zawsze grzyby są składową mikrobiomu przewodu pokarmowego indyków. Sytuacja pod tym względem zmieniała się radykalnie u indyków poddanych terapii antybiotykowej w wieku od 3 do 7 dnia życia, u których zawsze stwierdzano intensywny wzrost grzybów. Wynika z tego, że zastosowane leki przeciwbakteryjne u tak młodych ptaków zaburzają fizjologiczną kolonizację przewodu pokarmowego bakteriami, co w naturze trwa nawet przez 3 tygodnie, stwarzając dogodne warunki do rozwoju grzybów. Stąd słuszna uwaga Doktoranta o konieczności stosowania w takich przypadkach probiotyków, synbiotyków czy postbiotyków. Interesujące są wyniki badań czynników zjadliwości i profili genetycznych, zwłaszcza wykazanie u wszystkich 36 badanych izolatów *Candida albicans* aktywności fosfolipazowej, u 83% z nich aktywności hemolizynowej i zaledwie u 17% aktywności proteinazowej. Na podkreślenie zasługuje również stosunkowo niska oporność izolatów *Candida* spp. na badane specyfiki przeciwgrzybicze.

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 kandydiazy indyków i charakterystyki izolatów *Candida* spp. pod względem genotypowym, wirulencji i wrażliwości na specyfiki przeciwgrzybicze;
- badania zrealizowano z zastosowaniem tradycyjnych i nowoczesnych metod badawczych, co podnosi ich wartość naukową;
- wiarygodność praktyczną uzyskanych wyników badań podnosi fakt ich wykonania na bardzo dużej liczbie indyków w warunkach chowu fermowego;

- szczególnie istotne jest opublikowanie uzyskanych wyników badań w czterech pracach oryginalnych z listy JCR.

W mojej opinii rozprawa doktorska lek. wet. Ireneusza Sokoła stanowi bardzo wartościowe opracowanie naukowe dotyczące istotnego problemu jakim jest nie tylko występowanie u drobiu grzybów z rodzaju *Candida*, ale przede wszystkim dlatego, że dobitnie wykazano, iż stosowanie terapii przeciwbakteryjnej u piskląt indyckich wpływa na kolonizację przewodu pokarmowego grzybami. Świadczy to o tym, iż wyizolowanie od piskląt jednodniowych pałeczek *E. coli*, czy innych bakterii i natychmiastowe wdrożenie terapii z zastosowaniem chemioterapeutyków, co ma niestety często miejsce w praktyce, bez szczegółowej analizy tych izolatów pod względem cech chorobotwórczości, jest nieuzasadnione, a nawet błędem w sztuce lekarsko-weterynaryjnej.

Z obowiązku wnikliwego recenzenta pragnę zwrócić uwagę Doktorantowi na następujące, wcześniej nie wymienione niedociągnięcia:

- u ptaków nie występuje „ptasia grypa” tylko „grypa ptaków”;
- w odniesieniu do materiału biologicznego zamiast słowa „próby” należy używać „próbki”;
- jeżeli jest coś policzalne to nie należy używać słowa „ilość” a „liczba”, np. liczba szczepów, liczba grzybów.

Przedstawione uwagi krytyczne, które mają wyłącznie charakter porządkowy lub uzupełniający i dotyczą jedynie autoreferatu, a nie opublikowanych prac wchodzących w skład kompilacji, nie umniejszają wartości merytorycznej recenzowanej rozprawy i nie wpływają na jej jednoznacznie pozytywną ocenę.

W konkluzji wyrażam opinię, że rozprawa doktorska lek. wet. Ireneusza Sokoła pt. „Wpływ wczesnego podawania chemioterapeutyków na skład mikroflory grzybiczej przewodu pokarmowego indyków oraz charakterystyka fenotypowa wybranych izolatów” 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. Ireneusza Sokoła do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



prof. dr hab. Andrzej Koncicki