

Puławy, 2022-11-15

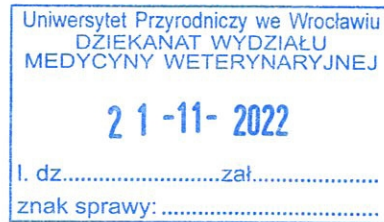
Dr hab. Grzegorz Tomczyk, profesor Instytutu

Państwowego Instytutu Weterynaryjny

- Państwowy Instytut Badawczy

Al. Partyzantów 57

24-100 Puławy



## Recenzja

rozprawy doktorskiej Pana Lek. wet. Ireneusza Sokoła

**p.t. „Wpływ wczesnego podawania chemioterapeutyków na skład mikroflory grzybiczej przewodu pokarmowego indyków oraz charakterystyka fenotypowa wybranych izolatów ”**

W patologii drobiu problem schorzeń tła grzybiczego obok chorób bakteryjnych, wirusowych czy inwazyjnych ma niezwykle istotne znaczenie. Grzybice narządowe czy układowe są bardzo często stwierdzane w patologii cennych ptaków ozdobnych jako następstwo stworzonych w warunkach wolierowych niekorzystnych parametrów środowiska. Z kolei w produkcji towarowej drobiu niezwykle w skutkach dla wyniku ekonomicznego produkcji jest następstwo przebytych infekcji grzybiczych. Biorąc pod uwagę, że patologiczne oddziaływanie grzybów na organizm ptaka skutkuje najczęściej trwałym i nieodwracalnym procesem anatomopatologicznym (uszkodzony przez grzyby narząd nie ulega pełnej regeneracji), wydolność produkcyjna w postaci oczekiwanych w oparciu o żywienie ptaka i jego potencjał genetyczny możliwości w tym zakresie nie zostaje wykorzystana. Równocześnie w odniesieniu do etiopatogenezy zakażeń grzybiczych u drobiu w powiązaniu do zaistnienia czynników sprzyjających rozwojowi drożdżycy (inaczej kandydiazy) spowodowanej chociażby nadmiernym stosowaniem w terapii innych chorób antybiotyków ciągle nie wiadomo wystarczająco dużo. Wydaje się, że występowanie tzw. „syndromu obwisłego wola” u indyków może mieć duży związek z występowaniem drożdżycy wywołanej grzybem z rodzaju *Candida*. W niektórych stadach problem ten może dotyczyć znaczącego odsetka ptaków i jest on bardziej zauważalny w stadach uprzednio traktowanych antybiotykami nawet zakładając, że w uzasadnionej terapii. Nie bez znaczenia na występowanie schorzeń w układzie oddechowym ptaków tła grzybiczego wywołanego grzybami z rodzaju *Aspergillus* ma także uprzednie niekiedy wielokrotne stosowanie terapii antybiotycznej wobec współistnienia zakażeń bakteryjnych. Tym samym symptomy chorobowe wynikające z etiologii wirusowej, bakteryjnej czy inwazyjnej mogą być maskowane poprzez wcześniej przebyte czy równoległe współistniejące zakażenia grzybicze. Należy jednocześnie pamiętać o pewnym „dobrodziejstwie” w monowalentnym zakażeniu grzybiczym i wynikającej z etiopatogenezy schorzenia, że w zasadzie ptak nie zakaża kolejnego ptaka w stadzie a główne źródła zarodników stanowi środowisko bytowania z równoczesnym współistnieniem czynników sprzyjających. Za takie z pewnością należy uznać poniekąd nieświadome „wyjaławianie” organizmu ptaków poprzez nadmierne używanie w terapii antybiotyków.

Powyższe stwierdzenia w jak największym stopniu uzasadniają podjęcie wyjaśnienia takowych kwestii jak w tytułowym założeniu przedmiotowej/recenzowanej Rozprawy Doktorskiej. Dodatkowo w etiopatogenezie choroby nie wiele jest wiadomo o roli gatunku grzybów będących w pierw komensalami a które wskutek zmian cech profili genetycznych stają się potencjalnymi patogenami. Rodzaj *Candida* obejmuje kilkadziesiąt gatunków grzybów, które mogą występować u zwierząt zarówno jako komensale, jak też jako patogeny. W odniesieniu do przewodu pokarmowego ptaków ich flora jelitowa może być źródłem endogennego zakażenia i rozwoju grzybicy wywołanej najczęściej przez grzyby należące do gatunku *Candida albicans*.

Recenzowana rozprawa ma formułę odbiegającą od przyjętego stereotypu, ponieważ Autor wykorzystał w niej, w miejsce tradycyjnego maszynopisu książki/monografii, wyniki badań opublikowanych częściowo w czasopismach naukowych zagranicznych i krajowych. Powyższy scenariusz, coraz powszechniej jest dzisiaj wykorzystywany a dopuszcza go ustawa z 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, art. 13 ust. 2 i 4 (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.), zgodnie z którą może on stanowić podstawę ubiegania się kandydata o nadanie stopnia naukowego doktora.

Promotorem pracy jest Prof. dr hab. Andrzej Gawęł, a promotorem pomocniczym dr n. wet. Kamila Bobrek. Obydwoje Państwo pracują w Katedrze Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Przedstawiona do recenzji Rozprawa doktorska Pana lek. wet. Ireneusza Sokoła jest spójnym cyklem pięciu publikacji (cztery oryginalne i jedna przeglądowa). Wszystkie prace są opublikowane w latach 2015-2020 w recenzowanych czasopismach. Jedna praca jest artykułem przeglądowym opublikowanym w krajowym czasopiśmie weterynaryjnym, natomiast pozostałe cztery to prace oryginalne, opublikowane w anglojęzycznych czasopismach zamieszczonych w bazie JCR. Łączny współczynnik wpływu (IF) prac wchodzących w skład cyklu wynosi 4,559, natomiast sumaryczna punktacja czasopism zgodnie z wykazami MN i SW wynosi 140. We wszystkich czterech publikacjach, oraz w artykule przeglądowym Doktorant jest pierwszym autorem a biorąc pod uwagę tematykę poszczególnych publikacji, w tym zwłaszcza prac eksperymentalnych można przyjąć, że stanowią one cykl spójny tematycznie, na co zwraca się uwagę w cytowanej Ustawie.

Wykaz prac stanowiących rozprawę doktorską:

### 3.1. PRACA PRZEGLĄDOWA:

3.1.1. Sokół Ireneusz, Bobrek Kamila, Tokarzewski Stanisław, Gawęł Andrzej: Kandidiaza u drobiu, *Medycyna Weterynaryjna*, 2015, 71, 731–735.

Impact Factor: 0,195, punkty MNiSW: 15

### 3.2. PRACE ORYGINALNE:

3.2.1. Sokół Ireneusz, Bobrek Kamila, Gawęł Andrzej, Tokarzewski Stanisław: 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



3.2.2. Sokół Ireneusz, Gaweł Andrzej, Bobrek Kamila: 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

3.2.3. Sokół Ireneusz, Gaweł Andrzej, Bobrek Kamila: 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

3.2.4. Sokół Ireneusz, Tokarzewski Stanisław, Bobrek Kamila, Gaweł Andrzej: 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 MNiSW: 40

Łącznie: punkty MNiSW= 140, IF = 4,559 wg wykazu czasopism MEN oraz Journal Citation Reports zgodnie z rokiem opublikowania prac.

Przeglądowa praca Autora doktoratu zamieszczona w *Medycynie Weterynaryjnej* zawiera logiczny przegląd i omówienie zagadnień związanych z rolą grzybów drożdżaków (*Candidia*) w patologii drobiu z uwzględnieniem etiopatogenezy choroby a także diagnostyki, leczenia i zapobiegania (praca 3.1.1)

Wykorzystując zawarte dane w publikacjach składających się na cykl Doktorat przygotował Rozprawę doktorską w skróconej wersji odtwarzając tradycyjny układ pracy doktorskiej. Wyeksponowane zostały zatem rozdziały: wprowadzenie/wstęp, założenia i cel pracy, metodyka badań zawarta w rozdziale- Badana populacja i metody, analiza wyników i statystyczna oraz omówienie wyników badań, wnioski, wykaz piśmiennictwa. Dołączył także streszczenie po polsku i abstract w języku angielskim. Dodatkowo zamieszczono kopie prac (publikacji) wchodzących w skład rozprawy oraz oświadczenia współautorów.

Wstęp napisany na 4 stronach zawiera szereg informacji a wprowadza on czytającego w tematykę problemu w patologii indyków jakim są zakażenia grzybicze. Należy jednak zwrócić uwagę na nieco przesadnie wyrażone dane nt. biologii indyka i skali jego produkcji w kraju w aspekcie ekonomicznym kosztem chociażby danych w zakresie przedstawienia bardziej szczegółowej etiopatogenezy grzybic u drobiu.

Doktorant planując swoje badania na indyczątach do zrealizowania zasadniczego celu pracy jakim była „**Ocena wpływu wczesnego podawania chemioterapeutyków na skład flory grzybiczej przewodu pokarmowego indycząt, określenie występujących rodzajów grzybów a także charakterystyka wybranych izolatów**”, wyznaczył sobie trzy zadania:

-określenie częstości występowania grzybów w przewodzie pokarmowym zdrowych indyków w 5 tygodniu życia oraz ich identyfikację gatunkową (zadanie zrealizowane w oparciu o dane z pracy 3.2.2)

-ocena zmian w składzie flory grzybiczej u indycząt po leczeniu określonymi grupami chemioterapeutyków w pierwszych dniach życia ptaków ( zadanie w ramach pracy 3.2.1);

-określenie lekooporności wybranych gatunków *Candida* oraz charakterystyka genotypowa i określenie czynników zjadliwości wybranych szczepów *Candida albicans* (zadanie w ramach pracy 3.2.3 i 3.2.4).

Do zrealizowania poszczególnych zadań wybrał stosowne metodyki badań a ich szczegółowy opis został przedstawiony w publikacjach składających się na niniejszą Rozprawę doktorską. Badania prowadzono w okresie trzech lat badając kolejno:

- fizjologiczny skład mykoflory przewodu pokarmowego, w oparciu o wymazy z jamy dziobowej, wola i kloaki od 5 tygodniowych indyków nie wykazujących objawów chorobowych i nie leczonych środkami przeciwbakteryjnymi ani przeciwgrzybiczymi. Badania mikologiczne wykonano z użyciem klasycznych podłoży mikrobiologicznych, oceniono cechy biochemiczne oraz wykonano analizę genetyczną izolatów (praca 3.2.2).

- badania wymazów w kierunku obecności grzybów w stadach w których uprzednio stosowano antybiotyki w dzień po zakończeniu leczenia oraz ponownie w piątym tygodniu życia (praca 3.2.1).

- prowadzono identyfikację rodzajów grzybów opartą o cechy morfologiczne izolatów (morfologia kolonii, badanie mikroskopowe) oraz ich wzrostu na podłożu chromogennym (praca 3.2.1, 3.2.2).

- określono przynależność gatunkową grzybów potwierdzaną na podstawie badań molekularnych. Badano wyizolowany materiał genetyczny grzybów z użyciem komercyjnego zestawu do jego izolacji. Amplifikację PCR przeprowadzano z użyciem gatunkowo specyficznych starterów (prace 3.2.2, 3.2.3, 3.2.4).

- patogenność izolatów grzybów *Candida albicans* w oparciu o posiadane czynniki wirulencji wynikających z obecności proteiny i fosforylasy oraz hemolizyny wywołującej rozpad erytrocytów a także zdolności do hamowania fagocytozy metodą wykorzystującą polimorfizm losowo amplifikowanych fragmentów DNA. Odczyty uzyskanych sekwencji były edytowane, analizowane i składane przy użyciu oprogramowania Mega 6. Sekwencje były porównywane z sekwencjami dostępnymi w bazie GenBank i zaszeregowane do określonych gatunków grzybów. Analiza profili genotypowych *Candida albicans* wykonana została z użyciem oprogramowania Quantity One (Biorad) metodą UPGMA (praca 3.2.3).

- w ostatnim etapie określono lekooporność izolatów *Candida albicans* dla amfoterycyny B, flukonazolu, itraconazolu i worykonazolu (praca 3.2.4).

Analizę statystyczną wykorzystaną do analizy danych w pracy 2.1 przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Statistica 12 Software.

Doktorant w oparciu o wykonane badania wykazał, że u zdrowych indyków przewód pokarmowy może być fizjologicznie zasiedlany przez grzyby stwierdzając aż w 12,4 % pobranych próbek obecność grzybów w oparciu o wykazany ich wzrost na podłożach diagnostycznych. Wśród grzybów występujących u zdrowych indyków wykazał dominację rodzaju *Candida* (88,5%), a także *Trichosporon* (odpowiednio u 7,7% próbek) oraz *Rhodotorula* (3,8%). Rodzaj *Candida* najczęściej obejmował gatunki *C. albicans*, *C. (Diutina) rugosa*, *C. glabrata*, *C. palmiophila*, oraz *C. (Diutina) catenulata*.

Autor stwierdził zależność pomiędzy częstością izolacji grzybów *Candidia* z przewodu pokarmowego indyków a stosowanym wcześniej leczeniem ptaków antybiotykami. Było to szczególnie wyrażone w stadach leczonych z udziałem jako podstawowego antybiotyku amoksycyliny i dotyczyło od 51 do 79 % próbek dodatnich. Stosunkowo mniej



dotatnich wyników (19-29%) odnosiło się do stad z wdrożoną terapią opartą na enrofloksacynie skojarzonej niekiedy z innymi antybiotykami.

Przeprowadzona charakterystyka izolatów *Candida albicans* na podstawie czynników zjadliwości i profili genetycznych wykazała, że wszystkie 36 (100%) izolatów posiadało aktywność fosfolipazową, 8 (17%) aktywność proteinazową, a 30 (83%) aktywność hemolizynową. W zależności od aktywności enzymatycznej wyróżniono trzy profile enzymatyczne. Doktorant stwierdził także wyraźną korelację pomiędzy profilami genotypowymi i enzymatycznymi analizowanych izolatów a dodatkowo przeprowadził ich dokładną analizę zależności.

Badania lekooporności izolatów *Candida* (*C. albicans*, *C. catenulata*, *C. glabrata*, *C. palmiroleophila*, *C. rugosa*, *C. krusei* i *C. lusitaniae*) wykazały, iż wszystkie szczepy były wrażliwe na worykonazol. Także zdecydowana grupa (98%) szczepów wrażliwa była na amfoterycynę B i flukonazol, natomiast jedynie u 21% szczepów stwierdzono wrażliwość na itrakonazol.

Z przeprowadzonych badań Doktorant wyciągnął 5 wniosków. Wnioski te odnoszą się bezpośrednio do wykonanych badań. Zawarte stwierdzenia we wniosku 3 wydają się jednak mniej precyzyjne albowiem zdaniem Recenzenta należało bardziej wyeksponować rolę amoksycyliny jako tej substancji antybiotycznej, która to wydatnie rzutowała znacząco na skład i mnogość grzybów *Candida* w mikroflorze organizmu ptaków. Amoksycyklina niezależnie od połączeń czy kombinacji i udziale w składzie preparatów leczniczych innych składników wydaje się mieć tą zasadniczą rolę jaką w swoich hipotezach badawczych zakładał Doktorant co także wskazał tą wiodącą rolę w omówieniu wyników badań (str. 16).

Przedstawione dane bibliometryczne świadczą o wysokim poziomie naukowym, a dowód stanowi fakt, że Doktorant opublikował wyniki swoich badań w czasopismach o znaczącej randze. Każda z tych prac przed opublikowaniem przeszła bowiem szczegółowy proces weryfikacyjny pod kątem wymagań jakie stawiane są pracom oryginalnym przez zespoły redakcyjne poszczególnych czasopism. Dlatego też zbędnym w mojej opinii jest dokonywanie odrębnej oceny przedstawionego przez Doktoranta cyklu publikacji. Cykl tych monotematycznych prac spełnia przyjęte w tym zakresie kryteria oceny. Dodatkowo poszczególne publikacje poddawane były niezależnej ocenie merytorycznej jednego lub kilku recenzentów będących przeważnie autorytetami w dziedzinie wiedzy, w której mieszczą się publikowane badania. Przy powyższej formule rozprawy doktorskiej zadaniem Recenzenta jest, aby zgodnie z zapisami odnośnego Rozporządzenia, ocenić indywidualny wkład kandydata do stopnia naukowego w powstanie pracy zbiorowej (publikacji). Najważniejszym wydają się zatem wykazanie, że oceniany cykl publikacji dowodzi kompetencji Doktoranta i jego dojrzałości do formułowania hipotez i koncepcji badań, ustalenie modelu doświadczalnego i przeprowadzenie prac doświadczalnych a następnie analizy wyników badań i wyciągania właściwych wniosków. Kryteria powyższe po ich spełnieniu stanowią dowód dojrzałości naukowej jako badacza i jest to jednym z warunków ubiegania się o stopień naukowy doktora w danej dyscyplinie.

Z uwagi na zbiorowe autorstwo cyklu prac, które stanowią podstawę ubiegania się Doktoranta o nadanie stopnia naukowego doktora, integralną część rozprawy doktorskiej stanowią oświadczenia współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych prac eksperymentalnych. Z załączonych oświadczeń wynika, że w przypadku większości publikacji współautorski udział Doktoranta był większościowy i wiodący. Ten wkład pracy obejmował udział w opracowaniu hipotez, koncepcji prowadzenia doświadczeń na zwierzętach, analizie i interpretacji wyników badań i wnioskowania oraz w pisaniu publikacji. Indywidualny udział pozostałych współautorów, zgodnie potwierdza w



oświadczeniach powyższe zaangażowanie Doktoranta. Analiza i ocena przytoczonych oświadczeń współautorów w powstawaniu poszczególnych prac eksperymentalnych upoważniają Recenzenta do stwierdzenia, że Doktorant jest w pełni uprawniony do uznawania prezentowanego cyklu publikacji jako podstawy ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora na podstawie rozprawy naukowej stanowiącej część pracy zbiorowej.

Równocześnie pozostając w roli Recenzenta pozwałam sobie skierować kilka uwag krytycznych. W kilkakrotnie eksponowanym w pracy przez Doktoranta terminie „mikrobiom” zdaniem Recenzenta należy się dopatrywać pewnego tzw. „nadużycia w interpretacji” albowiem w miejsce tego bardziej stosownym byłoby używanie stwierdzenia „badano mikrobiom indycząt w zakresie obecności grzybów”. Użycie takiego stwierdzenia uzasadnia fakt, że zbadanie całego „mikrobiomu” układu anatomicznego organizmu ptaków np. przewodu pokarmowego jest nie lada wyzwaniem a Autor tak szerokiego zakresu badań nie wykonywał.

Podobnie użycie niezbyt stylistycznych wyrażen: np. na str. 16 (Omówienie wyników badań)- „Wzrost ilości grzybów” w p. pokarmowym ptaków. Raczej chodzi o „wzrost liczebności grzybów” ponieważ ta wartość była mierzalna np. w odsetku grzybów (12,4) dla ptaków kontrolnych i porównywalna z odsetkiem w grupach badanych itp. Tu należy zauważyć, że odnośnie powyższego, Autor użył już tego właściwego stwierdzenia we Wniosku 2 „zwiększenie częstości izolacji grzybów”. Także w użytych przez Doktoranta określeniach „badania w stadach hodowlanych indyków”- czytający pracę w takim ujęciu ma przeświadczenie, że chodzi o stada reprodukcyjne indyków w których terminy pobierania prób dotyczyły okresu tzw. wychowu (w tym okres od 1 dnia życia ptaków do 5 tygodnia). Z kolei jeśli byłyby to rzeczywiście przyszłe stada reprodukcyjne indyków a nie stada tuczu (w chowie) to zdumiewającym byłoby wprowadzenie w wychowie przyszłych reproduktorów w terapii aż takiego panelu antybiotyków. Dodatkowo w takich sytuacjach zawsze nasuwa się zapytanie czy wymienione, stosowane w terapii i analizowane substancje antybiotyczne ordynowano ptakom w oparciu o wcześniejsze laboratoryjne badania antybiotykogramowe. Recenzent zakłada, że Doktorant w swym projektowaniu badań być może próbował odtwarzać sytuacje tzw. terenowej terapii. Obecnie przyjmowanymi tendencjami jest ograniczanie obecności wśród flory bakteryjnej tzw. donorów genetycznej oporności będącej skutkiem po stosowaniu leków. Powyższe stwierdzenia prawdopodobnie należy uznać za przeoczenia i do ewentualnego uwzględnienia i wyjaśnienia. Nie zmienia to w żaden sposób właściwego statusu przedstawionej do recenzji pracy. Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na drobne uchybienie literowe w tekście przedstawionym do oceny np. we Wprowadzeniu str. 10; jest „powierza” a powinno być „powietrza kurnika”.

Przeprowadzone badania wskazują na istotną rolę w zasiedlaniu układu pokarmowego ptaków przez grzyby w tym patogenne szczepy, kosztem fizjologicznej flory jelitowej po zaburzeniu jej działaniem antybiotyków stosowanych w terapii drobiu.

Podsumowując uważam, że recenzowana praca doktorska dotyczy interesującego zagadnienia z poznawczego i praktycznego punktu widzenia, problemu wpływu obecności grzybów na stan zdrowia i stan fizjologiczny indyków, w tak masowej jak w naszym kraju produkcji. Analiza i ocena prac eksperymentalnych ujętych w rozprawie a dotyczących roli zakażeń grzybami i etiopatogenezy dowodzi oryginalności rozwiązań problemu naukowego, a także ugruntowanej wiedzy Doktoranta w dziedzinie patologii ptaków. Świadczy także o doskonałym opanowaniu metodyki badań naukowych, zwłaszcza w odniesieniu do badań nad zagrożeniami grzybiczymi i zaburzeniami w tym zakresie mikrobiomu przewodu pokarmowego ptaków nie tylko w produkcji towarowej ale także np. u ptaków ozdobnych, co stanowi jeden z atrybutów umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej w dziedzinie tej wiedzy, którą Pan lekarz weterynarii Irenusz Sokół reprezentuje.

Przedstawiony w powyższej pracy doktorskiej model eksperymentalny w praktyce można zaadaptować także do innych gatunków ptaków jak użytkowanych wielosezonowo np. gęsi, kaczek czy strusi o których wiedza z powyższego obszaru jest na chwilę obecną raczej znikoma.

**Stwierdzam zatem**, że rozprawa doktorska Pana lekarza weterynarii Ireneusza Sokoła p.t. „Wpływ wczesnego podawania chemioterapeutyków na skład mikroflory grzybiczej przewodu pokarmowego indyków oraz charakterystyka fenotypowa wybranych izolatów ”, **odpowiada warunkom określonym w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i przedstawiam Wysokiej Radzie Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie Pana Ireneusza Sokoła do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Puławy, 2022-11-15

Dr hab. Grzegorz Tomczyk, prof. Instytutu  
Państwowy Instytut Weterynaryjny  
- Państwowy Instytut Badawczy  
Al. Partyzantów 57  
24-100 Puławy

