



Lublin, 20 czerwca 2022

Dr hab. Marta Fiołka, prof. UMCS
Katedra Immunobiologii
Instytut Nauk Biologicznych
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Tel. +48 815375050
E- mail: marta.fiolka@umcs.mail.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. wet. Dominika Łagowskiego zatytułowanej „Diagnostyka, epidemiologia i ocena zjadliwości dermatofitów zoofilnych wchodzących w skład kompleksów *Trichophyton benhamiae* i *T. mentagrophytes*” wykonanej w Zakładzie Mikrobiologii Weterynaryjnej, Katedry Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, pod kierunkiem dr. hab. Sebastiana Gnata, prof. UP

Ostatnie lata charakteryzują się nasileniem rozprzestrzeniania grzybic zarówno u ludzi jak i u zwierząt. Sprzyja temu proces szybkiego i powszechnego przemieszczania się ludzi do różnych miejsc globu, a tym samym zwiększanie obszaru zachorowań na grzybice różnego typu. Grzyby mogą łatwo przystosowywać się do zmieniających się warunków środowiska i dlatego charakteryzują się dużą zdolnością przetrwania w odmiennych ekosystemach. Zainfekowanie grzybem nie musi prowadzić do choroby grzybiczej. Jednak w określonych okolicznościach, przy osłabionym układzie odpornościowym lub podczas przyjmowania niektórych leków, może spowodować grzybicę powierzchniową lub układową. Powszechnie

występującymi grzybami chorobotwórczymi są dermatofity. Są to patogeny bytujące na powierzchni skóry, włosów i paznokci. Mikroorganizmy te prowadzą do rozwoju choroby grzybiczej – dermafitozy, charakteryzującej się rogowaceniem naskórka. Omawiane grzyby mogą być przenoszone w drodze kontaktu zarówno z osobą zakażoną jak i ze zwierzętami. Dermatofity w trakcie rozwoju tworzą rozgałęzioną grzybnię, która stanowi skupisko nitkowatych strzępek. Cechą charakterystyczną tych patogenów grzybowych jest powinowactwo do keratyny, która jest głównym budulcem warstwy rogowej naskórka oraz jego wytworów takich jak: włosy, sierść, rogi i kopyta. Białko to jest potrzebne do wzrostu i rozwoju dermatofitów. Dermatofity zoofilne wydają się być zaraźliwe i dlatego współpraca między lekarzami weterynarii, a dermatologami jest niezwykle pożądana i ważna przy identyfikacji źródła infekcji.

Rozprawa doktorska lek. wet. Dominika Łagowskiego składa się z cyklu siedmiu publikacji, których łączna punktacja wynosi według listy Ministerstwa Edukacji i Nauki 670 pkt, a łączny Impact Factor według listy JCR - 21,064. Lek. wet. Dominik Łagowski jest pierwszym autorem we wszystkich prezentowanych pracach.

Przedłożona rozprawa doktorska zawiera następujące rozdziały: spis treści, wykaz prac stanowiących osiągnięcie naukowe, streszczenie w języku polskim i angielskim, autoreferat, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, bibliografia oraz prezentowane publikacje wraz z oświadczeniami autorów o udziale w pracy. Na końcu rozprawy załączony jest niezwykle bogaty życiorys naukowy lek. wet. Dominika Łagowskiego.

Praca pierwsza z cyklu jest zatytułowana „**Comparison of *in vitro* activities of 11 antifungal agents against *Trichophyton verrucosum* isolates associated with a variety hosts and geographical origin**”. Autorami publikacji są: Dominik Łagowski, Sebastian Gnat, Aneta Nowakiewicz, Marcelina Osińska. Praca została opublikowana w *Mycoses*, 2020; 63(3):294-301, DOI: 10.1111/myc.13042, **IF: 4,377**; Punkty MEiN: **100 pkt**.

Wkład Doktoranta w powstanie powyższej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zebraniu kolekcji szczepów dermatofitów, wykonaniu analiz diagnostycznych, określeniu



profilu lekowrażliwości, interpretacji wyników oraz napisaniu części manuskryptu. Udział procentowy Doktoranta wynosi 80%.

W związku z faktem, że istnieją ograniczone dane *in vitro* dotyczące podatności grzyba *Trichophyton verrucosum* na leki przeciwgrzybicze, w pracy pierwszej dokonano oceny aktywności *in vitro* 11 leków przeciwgrzybiczych wobec dużej kolekcji izolatów *T. verrucosum* pozyskanych w Polsce, na Łotwie, Litwie i Słowacji od ludzi oraz zwierząt stosując test mikrorozcieńczenia. Badanie wrażliwości na 11 leków przeciwgrzybiczych *in vitro* było wykonane zgodnie z dokumentem Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M38.

Wykazano, że cyklopiroks miał wyższą aktywność przeciwko wszystkim szczepom niż pozostałe leki, przy czym flukonazol wykazywał najslabsze działanie *in vitro*, przy najwyższych wartościach MIC. Stwierdzono zadowalające działanie badanych przeciwgrzybiczych leków w stosunku do *T. verrucosum*. Zaobserwowano istotne różnice między izolatami *T. verrucosum* z Polski, Łotwy, Litwy i Słowacji pod względem wrażliwości na klotrimazol, enilkonazol, itrakonazol, ketokonazol, terbinafinę i worykonazol. Przeprowadzone badania dowodzą, że skuteczność terapeutyczna leku przeciwgrzybiczego powinna być ustalana w warunkach klinicznych. Są to cenne wskazówki dla lekarzy weterynarii zajmujących się problemem grzybic odzwierzęcych w różnych krajach.

W tym miejscu nasuwa mi się pytanie do Doktoranta: w jaki sposób uzyskał izolaty dermatofitów z tak wielu źródeł? Czy był to owoc współpracy międzynarodowej? Jak długo zajęło zebranie materiału klinicznego?

Praca druga zatytułowana „**Dermatophytosis with concurrent *Trichophyton verrucosum* and *T. benhamiae* in calves after long-term transport**”, autorstwa: Dominik Łagowski, Sebastian Gnat, Aneta Nowakiewicz, Marcelina Osińska, Aleksandra Trościańczyk, Przemysław Zięba, opublikowana została w *Veterinary Dermatology*, 2020; 31(5):414-e111, DOI: 10.1111/vde.12880, IF: **1,589**; Punkty MEiN: **100 pkt.**

Wkład Doktoranta w powstanie powyższej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, izolacji dermatofitów, wykonaniu analiz diagnostycznych i epidemiologicznych,



przeprowadzeniu interpretacji wyników, wyciągnięciu wniosków oraz napisaniu części manuskryptu. Udział procentowy lek. wet. Dominika Łagowskiego wynosi 80%.

W publikacji powyższej zaprezentowano problem dermatofitozy u bydła. Scharakteryzowano wielogatunkową infekcję cieląt (*Bos taurus*) po długotrwałym transporcie i szczepieniu przeciwko trichofitozie. Postawiono diagnozę korelując objawy kliniczne z badaniem mikroskopowym i makroskopowym grzybów. Do potwierdzenia przynależności gatunkowej wykorzystano analizy molekularne. Część grupy cieląt była zakażona jednym patogenem *T. verrucosum*, a u części stwierdzono równocześnie dwa gatunki *T. verrucosum* i *T. benhamiae*. Autorzy sugerują, że do tak dużej epidemii mogła przyczynić się immunosupresja zwierząt wynikająca ze stresu związanego z transportem i podaniem szczepionki. Badania te mają duże znaczenie poznawcze i wzbogacają wiedzę weterynaryjną na temat dermatofitów u bydła. Zwracają uwagę na ważne zagadnienie transportu zwierząt związane ze stresem, ograniczonym ruchem i łatwiejszą możliwością przenoszenia infekcji między osobnikami.

Również w przypadku tej pracy uwagę przyciągają zdjęcia makroskopowe i mikroskopowe wyizolowanych patogenów. Pokazane zostały również zmiany chorobotwórcze na skórze zwierzęcia. Już starożytni Rzymianie użyli terminu *tinea*, porównując obraz zmiany klinicznej do efektu działania larwy mola odzieżowego. W przypadku zaprezentowanego obrazu porównanie to znajduje pełne uzasadnienie.

Praca trzecia pt. „**In search of the source of dermatophytosis: Epidemiological analysis of *Trichophyton verrucosum* infection in llamas and the breeder (case report)**”, której autorami są: Dominik Łagowski, Sebastian Gnat, Aneta Nowakiewicz, Marcelina Osińska, Aleksandra Trościańczyk, Przemysław Zięba, została opublikowana w *Zoonoses and Public Health*, 2019; 66(7):982-989, DOI: 10.1111/zph.12648, IF: **2,271**; Punkty MEiN: **100 pkt.**

Wkład Doktoranta w powstanie wymienionej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu analiz diagnostycznych i epidemiologicznych, wyciągnięciu wniosków oraz napisaniu części manuskryptu. Jego udział procentowy wynosi 80%.



W publikacji przeanalizowano przypadek zakażenia dermatofitem lam i ich hodowcy. Wyniki przedstawione w pracy pokazały, że makro i mikromorfologiczne zdjęcia izolatów były charakterystyczne dla *T. verrucosum*. Filogenetyczna analiza udowodniła, że szczepy dermatofitów uzyskane od lamy i hodowcy tworzą grupę monofiletyczną z *T. verrucosum* CBS365.53. Otrzymane elektroforogramy z analizy MP-PCR i MSP-fingerprinting wykazały dużą niezmiennność genomów. Wszystkie izolaty kliniczne charakteryzowały się aktywnością keratynazy, fosfolipazy, elastazy i proteazy. Na uwagę zasługują wyniki obrazowania mikroskopowego materiału klinicznego pochodzącego od lamy i człowieka. Praca ma aspekt poznawczo-praktyczny.

Praca czwarta pt. **"Application of genotyping methods in the investigation of sources of dermatophytosis associated with vaccination in cattle"** autorstwa: Dominik Łagowski, Sebastian Gnat, Aneta Nowakiewicz, Marcelina Osińska, Przemysław Zięba, została opublikowana w czasopiśmie *Annals of Applied Biology*, 2020; 177(3):325-332, DOI: 10.1111/aab.12618, IF: **2,750**; Punkty MEiN: **100 pkt**.

Wkład Doktoranta w powstanie powyższej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zebraniu puli izolatów dermatofitów, wykonaniu genotypowania, interpretacji wyników oraz napisaniu części manuskryptu. Udział procentowy Doktoranta wynosi 80%.

W prezentowanej publikacji analizowano przydatność metod genotypowania w identyfikacji źródła zakażenia dermatofitami. Badana była infekcja w przypadkach skorelowanych z podaniem szczepionki przeciwko trichofitozie. Otrzymane wyniki wykazały, że dermatofity wyizolowane ze zmian skórnych u cieląt przejściowo związane z podaniem szczepionki miały identyczny profil elektroforetyczny z szczepem szczepionkowym i różnił się on od szczepu referencyjnego *Trichophyton verrucosum* CBS365.53. Udowodniono ponadto, że metody genotypowania są użytecznym narzędziem do szybkiego i niezawodnego identyfikowania źródła zakażenia u cieląt. Przeprowadzone badania ujawniły grzybicę skóry wywołaną przez *T. verrucosum* na fermach bydła po podaniu pierwszej dawki szczepionki na trichofitozę. Stwierdzenie czy szczepionka jest źródłem takich infekcji wydaje się zasadnicze do podjęcia właściwej decyzji terapeutycznej. Zastosowane techniki genotypowania oparte na



analizie podobieństwa całych genomów dermatofitów wydaje się być bardzo przydatne przy podejmowaniu decyzji o kierunku leczenia. Badania przeprowadzone przez lek. wet. Dominikę Łagowską i współpracowników mają bardzo ważny aspekt praktyczny. Są cenną wskazówką dla lekarzy weterynarii stykających się z tym problemem i mogą prowadzić do szybszego wyleczenia zakażonych zwierząt. Na uwagę zasługuje zobrazowanie zmian klinicznych podczas infekcji.

Chciałabym zapytać Doktoranta, jak szybko po uzyskaniu materiału należy go dokumentować i jakie napotkał trudności w przy przeprowadzaniu tych analiz? Czy Doktorant ma jakieś własne zdanie dlaczego tak się dzieje, że po szczepieniu są obserwowane opisane zmiany? Czy mogą się tego przyczynić jakieś specyficzne warunki środowiskowe np. dieta lub warunki utrzymania?

Publikacja piąta z cyklu pt. **”Assessment of the subtilisin gene profile in *Trichophyton verrucosum* isolated from human and animal dermatophytoses in two-stage multiplex PCR”** autorstwa Dominik Łagowski, Sebastian Gnat, Aneta Nowakiewicz, Marcelina Osińska opublikowana została w czasopiśmie *Journal of Applied Microbiology*, 2021; 131(1):300-306, DOI: 10.1111/jam.14942, IF: **3,772**; Punkty MEiN: **70 pkt.**

Wkład Doktoranta w powstanie powyższej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaprojektowaniu starterów, wykonaniu PCR i elektroforezy, interpretacji wyników oraz napisaniu części manuskryptu. Jego udział procentowy wynosi 80%.

Proteazy podobne do subtilizyny to endoproteazy, które są zdolne do rozkładu struktur keratynowych. W prezentowanych badaniach zidentyfikowano geny *SUB* endoproteaz serynowych w 30 klinicznych izolatach *Trichophyton verrucosum* uzyskanych z dermatofityz ludzkiej i zwierzęcej oraz bezobjawowych nosicieli zwierzęcych. Autorzy pracy zaprojektowali dwustopniowy multipleks PCR - technikę wykrywania wszystkich siedmiu genów kodujących proteazy serynowe u dermatofitów. Badacze sugerują, że nasilenie zakażenia i zdolność *T. verrucosum* do wywoływania dermatofityz u ludzi może nie być związana z konkretnym genem, ale ich akumulacją i synergicznym działaniem ich produktów.



Zaprojektowana przez autorów technika wzbogaca wiedzę na temat mechanizmu zakażeń dermatofitami i może pomóc w monitorowaniu i leczeniu infekcji u zwierząt i ludzi. Chciałabym zapytać, czy Doktorant mógłby przybliżyć jak długo trwało opracowanie tej techniki i czy nie brał pod uwagę opatentowania zaprojektowanego sposobu badań?

Praca szósta pt. **„Real-time PCR as an alternative technique for detection of dermatophytes in cattle herds”** autorstwa Dominik Łagowski, Sebastian Gnat, Aneta Nowakiewicz, Aleksandra Trościańczyk została wydana w czasopiśmie *Animals*, 2021; 11(6):1662, DOI: 10.3390/ani11061662, IF: 2,752; Punkty MEiN: 100 pkt.

Wkład Doktoranta w powstanie powyższej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zebraniu kolekcji szczepów dermatofitów, wykonaniu identyfikacji fenotypowej i analiz czynników wirulencji, interpretacji wyników, wyciągnięciu wniosków oraz napisaniu części manuskryptu. Udział procentowy Doktoranta oszacowano na 80%.

Przedstawione badania miały na celu ocenę specyficzności analitycznej i zastosowania klinicznego PCR w czasie rzeczywistym dla próbek bezpośrednio pobranych od zwierząt oraz porównanie tej techniki z bezpośrednią mikroskopią i metodami hodowli. Użyte startery w technice qPCR ułatwiły wykrycie obecności genów dermatofitów bardziej specyficzniej niż badanie mikroskopowe. W pracy przeanalizowano aktywność enzymatyczną i hemolityczną klinicznych izolatów dermatofitów. W publikacji opisano przypadek izolacji dwóch różnych gatunków dermatofitów *Trichophyton verrucosum* i *T. benhamiae*, które wywoływały takie same zmiany kliniczne. Zaprezentowana metoda molekularna może być stosowana z powodzeniem przy wykrywaniu i monitorowaniu dermatofitozy u bydła. Na uwagę zasługuje bardzo profesjonalna i dobrze opracowana dokumentacja obrazów mikroskopowych. Przedstawione badania mają duże znaczenie praktyczne i są cennymi obserwacjami dla lekarzy weterynarii.

Publikacja siódma z cyklu pt. **„Intrinsic resistance to terbinafine among human and animal isolates of *Trichophyton mentagrophytes* related to amino acid substitution in the squalene epoxidase”** autorstwa: Dominik Łagowski, Sebastian Gnat, Aneta Nowakiewicz,



Marcelina Osińska, Mariusz Dyląg została opublikowana w *Infection*, 2020; 48(6):889-897, DOI: 10.1007/s15010-020-01498-1, IF: 3,553; Punkty MEiN: 100 pkt.

Wkład Doktoranta w powstanie powyższej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zebraniu izolatów klinicznych i ich identyfikacji, określeniu profilu lekowrażliwości i sekwencjonowaniu genu epoksydazy skwalenowej, analizie bioinformatycznej oraz napisaniu części manuskryptu. Jego udział procentowy wynosi 80%.

W pracy opisano izolaty *T. mentagrophytes* odporne na terbinafinę, wśród których jeden był czynnikiem etiologicznym grzybicy u mężczyzny, a trzy pochodziły od bezobjawowych lisów. Określono wrażliwość przeciwgrzybiczą na wybrane antybiotyki. Wykazano, że oporność na terbinafinę może zostać nabyta nie w drodze ekspozycji na lek, lecz może powstać samoistnie. O zjawisku tym świadczy opis szczepów opornych na terbinafinę wyizolowanych z bezobjawowych zwierząt. W badaniach dowiedziono, że wysoki poziom oporności na terbinafinę *in vitro* może pojawić się wraz z mutacjami w genie epoksydazy skwalenu, w klinicznych izolatach *T. mentagrophytes*, zarówno u zwierząt jak i ludzi. Przeanalizowano łącznie 29 klinicznych izolatów tego grzyba uzyskanych od pacjentów z dermatofitozą oraz objawowych i bezobjawowych zwierząt pochodzących z różnych rejonów Polski. Zaprezentowane badania mają ważny aspekt poznawczy i praktyczny.

Nasuwa mi się pytanie do Doktoranta: czy istnieje współpraca między lekarzami weterynarii, a dermatologami zajmującymi się problemem grzybicy odzwierzęcych?

Podsumowanie

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska lek. wet. Dominika Łagowskiego stanowi oryginalny i ważny wkład w tematykę zakażeń grzybowych u zwierząt i ludzi. Doktorant udowodnił swoimi badaniami, że wielokierunkowa identyfikacja będąca korelacją metod makro i mikromorfologicznych oraz sekwencjonowania markera ITS powinna być częścią rutynowej diagnostyki mikologicznej przy podejrzeniu dermatofitozy, oraz że technika qPCR ze starterami grupowo swoistymi jest szybszą i tańszą alternatywą wobec klasycznej diagnostyki.



Rzetelnie przeprowadzone badania zostały opublikowane w znaczących, wysoko punktowanych czasopismach. Cykl siedmiu publikacji w prestiżowych czasopismach to rzadkie osiągnięcie prezentowane jako rozprawa doktorska. Zaprezentowane prace zasługują na duże uznanie i świadczą o niezwyklej pracowitości Doktoranta. Przedstawiony do oceny cykl publikacji mógłby równie dobrze stanowić dorobek do habilitacji. Jakość przeprowadzonych badań, pozwala stwierdzić, że autor osiągnięcia cechuje się dużą biegłością w stosowaniu warsztatu różnych technik zwłaszcza molekularnych. Ta bardzo dobra praca naukowa pozwala na wyznaczenie nowych celów badawczych i analizę ważnych problemów naukowych. Wnosi znaczący wkład w rozwój dyscypliny weterynaria oraz postrzeganie polskich badań w tym zakresie na arenie międzynarodowej.

Uważam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymogi Ustawy z dnia 14.03.2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65 poz. 595 z późn. zm.) w zw. art.179 ust.3 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) i wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o dopuszczenie lek. wet. Dominika Łagowskiego do dalszych etapów obrony rozprawy doktorskiej.

Jednocześnie, mając na uwadze wysoką ocenę merytoryczną prezentowanych badań, rzetelność Doktoranta w planowaniu i przeprowadzaniu eksperymentów, oraz bogaty dorobek naukowy Doktoranta, wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o **stosowne wyróżnienie rozprawy doktorskiej**.

Z poważaniem
dr hab. Marta Fiołka, prof. UMCS

