



Prof. dr hab. Jarosław Bystróż
Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

OCENA

pracy doktorskiej lek. wet. Przemysława Knysza

pt. „Bakterie rodzaju *Enterococcus* izolowane z tusz zwierząt rzeźnych i dziczyzny jako potencjalne zagrożenie zdrowia konsumenta”

wykonanej w Katedrze Higieny Żywności Zwierzęcego Pochodzenia
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie
pod kierunkiem promotora prof. dr. hab. Krzysztofa Szkucika
oraz promotora pomocniczego dr. Michała Gondka

Podstawę prawną wykonania recenzji rozprawy doktorskiej stanowi uchwała Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 28 września 2022 r.

Stale narastająca lekooporność bakterii, szczególnie chorobotwórczych i oportunistycznych stanowi współcześnie niezmiernie istotny i pogłębiający się problem związany z zapewnieniem skutecznego leczenia infekcji bakteryjnych ludzi i zwierząt. Jedną z grup mikroorganizmów wykazujących ponadprzeciętną zdolność nabywania oporności na wiele klinicznie stosowanych substancji przeciwdrobnoustrojowych są bakterie z rodzaju *Enterococcus*. Niektóre gatunki z rodzaju *Enterococcus*, ze względu na wspomnianą zdolność „ucieczki” przed antybiotykami zaliczane są obecnie do grupy drobnoustrojów o akronimie „ESKAPE” (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* spp.), co uwypukla poziom zagrożenia jakie stanowią bakterie *Enterococcus* spp. dla zdrowia ludzi.

Bakterie z rodzaju *Enterococcus* to drobnoustroje oportunistyczne wśród których gatunki *E. faecium* i *E. faecalis* są coraz częściej przyczyną poważnych infekcji ludzi, głównie z osłabioną odpornością np. z powodu leczenia onkologicznego czy transplantacji narządów. Szczególne zagrożenie dla zdrowia publicznego stanowią wankomycynooporne szczepy *Enterococcus faecium*, często równocześnie wielolekooporne, których udział w infekcjach ludzi wywołanych przez bakterie z rodzaju *Enterococcus* stale wzrasta w Polsce i Europie.



Naturalnym środowiskiem bytowania bakterii z rodzaju *Enterococcus* jest przewód pokarmowy zwierząt, w tym rzeźnych, skąd w wyniku nieprzestrzegania właściwych procedur sanitarnych podczas procesu patroszenia mogą łatwo zanieczyszczać powierzchnię tusz i finalnie produkty mięsne z nich wytwarzane. Dodatkowo występowaniu bakterii *Enterococcus* spp. w produktach pochodzenia zwierzęcego sprzyja zdolność ich adaptacji do niekorzystnych warunków środowiskowych, co umożliwia im przetrwanie wielu procesów przetwórczych stosowanych w czasie wytwarzania żywności.

Badania dotyczące występowania bakterii *E. faecium* i *E. faecalis* na powierzchni tusz zwierząt rzeźnych i łownych oraz w żywności, a także ich zróżnicowania genetycznego czy oporności na substancje przeciwdrobnoustrojowe były wcześniej częściowo prowadzone w Polsce i na świecie. Należy jednak podkreślić, że były one ograniczone do wąskiej grupy badanych tusz zwierząt czy produktów spożywczych, dotyczyły nielicznej populacji bakterii i skupiały się na jednym obszarze badań. Do tej pory brak kompleksowych badań obejmujących zarówno określenie występowania bakterii *Enterococcus* spp. na powierzchni tusz zwierząt rzeźnych i łownych, ocenę ich oporności na klinicznie stosowane substancje przeciwdrobnoustrojowe, jak i analizę pokrewieństwa genetycznego, szczególnie lekoopornych, oportunistycznych szczepów *E. faecium* i *E. faecalis*, czego podjął się Autor niniejszej pracy doktorskiej.

Biorąc pod uwagę powyższe fakty stwierdzam, że tematyka pracy doktorskiej lek. wet. Przemysława Knysza obejmuje aktualne i istotne zagadnienia w obszarze weterynaryjnej ochrony zdrowia publicznego związane z oceną występowania, lekooporności i zróżnicowania genetycznego bakterii *E. faecium* i *E. faecalis* izolowanych z tusz zwierząt rzeźnych i dziczyzny.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma klasyczny układ i składa się z następujących rozdziałów: wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie w j. polskim i angielskim oraz piśmiennictwo. Łącznie praca liczy 205 stron A4.

We wstępie pracy Doktorant przedstawił aktualną systematykę oraz scharakteryzował czynniki wirulencji bakterii z rodzaju *Enterococcus*. Następnie opisał mechanizmy oporności bakterii *E. faecium* i *E. faecalis* na poszczególne klasy substancji przeciwdrobnoustrojowych, a także szczegółowo omówił zasady i technologię uboju zwierząt rzeźnych oraz pozyskania dziczyzny. Kolejną cenną częścią tego rozdziału jest omówienie znaczenia klinicznego bakterii z rodzaju *Enterococcus* oraz wynikającego z ich obecności w żywności zagrożenia dla zdrowia



konsumenta, w której Autor w bardzo trafny sposób uzasadnił celowość podjętych badań. Dodatkowo należy podkreślić, że informacje zawarte w każdym podrozdziale wstępu są merytoryczne, aktualne i zaprezentowane w przejrzysty sposób.

Mając na uwadze informacje przedstawione we wstępie pracy Doktorant podjął badania mające na celu: (1) określenie częstości występowania bakterii z rodzaju *Enterococcus* na powierzchni tusz bydła i świń, tuszek królików i drobiu, a także tusz dzików, pochodzących z rzeźni oraz zakładów przetwórstwa dziczyzny zlokalizowanych na obszarze Polski, uwzględniając częstość występowania dwóch gatunków powodujących groźne zakażenia ludzi (*Enterococcus faecium* i *Enterococcus faecalis*), (2) oznaczenie występowania oporności fenotypowej na antybiotyki wyizolowanych izolatów *E. faecium* i *E. faecalis* oraz częstości występowania istotnych z punktu widzenia ochrony zdrowia publicznego szczepów wielolekoopornych (MDR), (3) określenie w wyizolowanych szczepach *E. faecium* i *E. faecalis* obecności genetycznych determinant oporności (genów warunkujących oporność na poszczególne grupy antybiotyków) i korelacja ich występowania z prezentowanymi cechami fenotypowej oporności oraz (4) określenie podobieństwa genetycznego szczepów *E. faecium* oraz *E. faecalis* wyizolowanych z tusz poszczególnych gatunków ubitych zwierząt rzeźnych oraz dzików metodą ADSRRS fingerprint.

Rozdział „Materiał i metody” Autor przedstawił w formie 3 głównych podrozdziałów, które poświęcił na opis:

- sposobu pobierania próbek do badań z tusz bydła, świń i dzików oraz tuszek drobiu i królików,
- fenotypowej identyfikacji bakterii z rodzaju *Enterococcus* i molekularnej identyfikacji szczepów *E. faecium* i *E. faecalis*,
- wykrywania obecności genów oporności na substancje przeciwdrobnoustrojowe metodą multiplex PCR,
- oznaczania oporności izolatów *E. faecium* i *E. faecalis* na wybranych 10 substancji przeciwdrobnoustrojowe metodą mikrorozcieńczeń,
- określania podobieństwa genetycznego wybranych szczepów *E. faecium* oraz *E. faecalis* metodą amplifikacji fragmentów DNA otaczających rzadkie miejsca restrykcyjne (ADSRRS fingerprint),
- metod zastosowanych do analizy statystycznej otrzymanych danych.



Metodyka została przejrzysto i poprawnie opisana oraz zaplanowana adekwatnie do założonego planu badań. Zastosowano nowoczesne techniki biologii molekularnej, co obrazuje wysoki poziom badań zrealizowanych przez Doktoranta. Na podkreślenie zasługuje także spora liczba, bo aż 1262 badanych przez Doktoranta próbek, co gwarantuje uzyskanie precyzyjnych danych np. dotyczących poziomu zanieczyszczenia tusz zwierzęcych bakteriami *Enterococcus* spp., a także pozostałych danych wynikających z zaplanowanych celów badań. Drobnym mankamentem tego rozdziału jest brak informacji od jakiego gatunku ptaków zaliczanych do drobiu rzeźnego pobierano wymazy do badań.

W części eksperymentalnej pracy lek. wet. Przemysław Knysz wykazał obecność bakterii z rodzaju *Enterococcus* na powierzchni 1112 (88%) tusz badanych zwierząt. Bakterie z rodzaju *Enterococcus* wyizolował z powietrza 107 (67%) tusz świń, 425 (86%) tuszek królików, 181 (92%) tusz bydła, 187 (94%) tuszek drobiu i 212 (100%) tusz dzików.

Obecność bakterii *E. faecalis* stwierdził na powierzchni 527 (47%), a *E. faecium* na powierzchni 76 (6,8%) tusz zwierząt na których wykryto obecność *Enterococcus* spp. Wykazał, że niezależnie od gatunku badanego zwierzęcia, na powierzchni tusz *E. faecalis* występował statystycznie istotnie częściej w porównaniu do *E. faecium*. Obecność bakterii *E. faecalis* stwierdził na powierzchni 14,9% tusz bydła, 29,7% tusz dzików, 38,3% tusz świń, 55,8% tuszek królików oraz 85% tuszek drobiu na których wykryto *Enterococcus* spp. Z kolei obecność bakterii *E. faecium* stwierdził na powierzchni 5,6% tuszek drobiu, 7,7% tusz bydła, 11,2% tusz świń oraz 18,4% tusz dzików na których wykryto *Enterococcus* spp. Nie stwierdził *E. faecium* na żadnej ze zbadanych tuszek królików.

Analizując częstość występowania bakterii *E. faecalis* i *E. faecium* wykazał, że na powierzchni tuszek drobiu i królików była ona istotnie wyższa w porównaniu do występowania *E. faecalis* i *E. faecium* na powierzchni tusz bydła, świń i dzików.

Oceniając lekooporność szczepów metodą mikrorozcieńczeń Doktorant wykazał, że szczepy *E. faecalis* wyizolowane z tuszek drobiu, królików i bydła były najczęściej odporne na tetracyklinę i erytromycynę, a z tusz świń i dzików na tetracyklinę. Z kolei analizując oporność szczepów *E. faecium* wyizolowanych z tuszek królików wykazał, że najczęściej były one odporne również na tetracyklinę i erytromycynę, a te wyizolowane z tusz bydła, świń i dzików na enrofloksacynę. Wykazał ponadto, że bakterie *E. faecalis* i *E. faecium* pochodzące z tusz dzików wykazują największą wrażliwość na gentamycynę. Oceniając dystrybucję szczepów



wielolekoopornych wśród badanej populacji bakterii stwierdził, że szczepy *E. faecalis* i *E. faecium* pochodzące z tuszek drobiu i królików najczęściej wykazywały cechy wielolekooporności (MDR).

Należy dodać, że lek. wet. Przemysław Knysz badania z zakresu lekooporności fenotypowej wykonał kompleksowo i wielopłaszczyznowo stosując do oceny wrażliwości drobnoustrojów kryteria według kilku norm tj. CLSI (2013 i 2014), EUCAST (2022) i NARMS (2011). Oznaczył nie tylko oporność szczepów *E. faecalis* i *E. faecium* wyizolowanych od poszczególnych gatunków zwierząt oraz ich wielolekooporność, a także określił wartości MIC₅₀ i MIC₉₀ oraz fenotypowe profile oporności szczepów *E. faecalis* i *E. faecium* wyizolowanych z tusz zwierząt rzeźnych i dzików.

W kolejnym etapie badań Doktorant ocenił występowanie genów oporności na antybiotyki aminoglikozydowe, makrolidy, tetracykliny i glikopeptydy wśród szczepów *E. faecalis* i *E. faecium*. Wykazał, że w populacji bakterii *E. faecalis*, wyizolowanych od zwierząt rzeźnych najwięcej szczepów wykazywało obecność genów *tetM* (84,3% szczepów) i *ermB* (73,3% szczepów) warunkujących oporność odpowiednio na tetracykliny i makrolidy. Podobne wyniki uzyskał, analizując szczepy *E. faecalis* pochodzące od dzików, w przypadku których najczęściej wykrywanymi genami warunkującymi oporność bakterii na substancje przeciwdrobnoustrojowe były: *tetM* (61,9% szczepów), *ermB* (25,4% szczepów) i *tetO* (27% szczepów). Z kolei wśród izolatów *E. faecium*, pochodzących od zwierząt rzeźnych i dzików najczęściej identyfikował obecność genów *tetM* oraz *tetI*, warunkujących oporność tych drobnoustrojów na tetracykliny. Wykazał, że izolaty *E. faecalis* wyizolowane z tusz zwierząt rzeźnych częściej posiadały geny oporności na aminoglikozydy, makrolidy i tetracykliny w porównaniu do izolatów pochodzących z tusz dzików. Z kolei szczepy z gatunku *E. faecium* wyizolowane z tusz zwierząt rzeźnych częściej posiadały geny oporności na gentamycynę i inne aminoglikozydy, z wyjątkiem streptomycyny oraz makrolidy w porównaniu do szczepów wyizolowanych z tusz dzików. W żadnym ze szczepów *E. faecalis* i *E. faecium* nie stwierdził obecności genów *vanA* i *vanB* warunkujących oporność na wankomycynę.

Do oceny podobieństwa genetycznego szczepów *E. faecalis* i *E. faecium* metodą ADSRRS-fingerprint Autor wybrał izolaty wykazujące oporność na największą liczbę substancji przeciwdrobnoustrojowych. Spośród gatunku *E. faecalis* analizie poddał 5 grup bakterii pozyskanych z tusz bydła, świń, drobiu, królików i dzików, które zawierały odpowiednio 8, 19,



30, 30 i 49 szczepów. Natomiast spośród gatunku *E. faecium* analizie poddał 4 grupy izolatów tj. 10 szczepów wyizolowanych z tusz bydła, 7 z tusz świń, 10 z tuszek drobiu i 27 z tusz dzików. Przeprowadzona przez Doktoranta analiza wykazała, że wśród wielolekoopornych szczepów *E. faecalis* pochodzących z powierzchni tusz świń, bydła i drobiu, a także wielolekoopornych szczepów *E. faecium* wyizolowanych z tusz świń i dzików występują dwie główne grupy genetyczne. Z kolei w grupie szczepów *E. faecalis* pochodzących z tusz dzików i z tuszek królików, a także szczepów *E. faecium* wyizolowanych z tusz bydła stwierdził cztery główne grupy genetyczne

Podsumowując rozdział „Wyniki” należy podkreślić, że wszystkie wyniki badań, mimo ich mnogości zostały przedstawione w sposób bardzo czytelny i uporządkowany. Ponadto zostały zilustrowane aż 39 przejrzystymi tabelami i 19 wysokiej jakości rycinami. Pewnym niedostatkiem pracy jest brak analizy podobieństwa genetycznego w obrębie wszystkich 116 wielolekoopornych szczepów *E. faecalis*, a także 54 szczepów *E. faecium*. Umożliwiłoby to ocenę podobieństwa opornych szczepów *E. faecalis/E. faecium* pochodzących od różnych gatunków zwierząt.

W rozdziale „Dyskusja” lek. wet. Przemysław Knysz w sposób dojrzały i rzeczowy konfrontuje uzyskane wyniki badań własnych z dostępną literaturą. Obszerna polemika zawiera wiele trafnych stwierdzeń i komentarzy. Autor wyczerpująco omawia wyniki pracy odwołując się do aktualnej literatury przedmiotu. Piśmiennictwo zawiera 164 pozycje literaturowe, głównie anglojęzyczne i w zdecydowanej większości opublikowane po 2010 roku. Pozytywnym zaskoczeniem jest obecność wśród cytowanych pozycji literaturowych (poz. 132) także anglojęzycznej pracy naukowej opublikowanej w roku 1937 dotyczącej klasyfikacji bakterii z rodzaju *Streptococcus*, co świadczy o gruntownym zgłębieniu tematu badawczego przez Doktoranta.

Wyniki badań własnych Autor zebrał w postaci 13, w zdecydowanej większości precyzyjnych i zwięźle sformułowanych wniosków odpowiadających celom pracy. Z drobnych zastrzeżeń uważam, że wniosek 9 mówiący, że „Stosując technikę ADSRRS fingerprint można wskazać co najmniej dwa źródła zanieczyszczenia powierzchni tusz zwierząt rzeźnych i dzików wielolekoopornymi bakteriami z rodzaju *Enterococcus*” należałoby zmienić na: „Zastosowana technika ADSRRS fingerprint wskazuje na istnienie co najmniej dwóch grup pokrewieństwa genetycznego wśród wielolekoopornych bakterii z rodzaju *Enterococcus* występujących na



powierzchni tusz zwierząt rzeźnych i dzików”. Obecność różnych typów genetycznych wśród szczepów wyosobnionych z danego środowiska może być cechą naturalną. Może też wskazywać na odmienne źródła pochodzenia bakterii, ale żeby to wykazać trzeba przeprowadzić zarówno analizę źródeł jak i badanego środowiska, na co wskazał Doktorant w dalszej części tego wniosku pisząc: „W celu niezawodnej identyfikacji źródeł pochodzenia konieczne są dalsze badania z wykorzystaniem próbek pobranych na różnych etapach procesu produkcji tusz”.

Podsumowując stwierdzam, że oceniana praca dotyczy aktualnych i istotnych zagadnień w obszarze weterynaryjnej ochrony zdrowia publicznego. Na uwagę zasługuje także ogrom pracy Autora poświęcony na zebranie pokaźnego materiału do badań, analizę uzyskanych wyników oraz napisanie rozprawy doktorskiej.

Najważniejszym osiągnięciem recenzowanej pracy jest wykazanie znacznie częstszego występowania bakterii *E. faecalis* w porównaniu do *E. faecium* na powierzchni tusz bydła, świń, drobiu, królików i dzików, a także powszechnej fenotypowej oporności szczepów *E. faecalis* na tetracyklinę i erytromycynę, co może świadczyć o nagminnym stosowaniu powyższych antybiotyków w trakcie chowu zwierząt rzeźnych. Istotnym osiągnięciem pracy jest również wykazanie, że szczególne zagrożenie dla zdrowia konsumenta stanowią szczepy *E. faecalis* i *E. faecium* pochodzące z tuszek drobiu i królików, bowiem najczęściej wykazywały one cechy wielolekooporności.

Należy dodać, że istotny i unikatowy charakter mają także badania Doktoranta oceniające podobieństwo genetyczne w których wykazał istnienie co najmniej dwóch typów genetycznych wśród wielolekoopornych szczepów *E. faecalis* i *E. faecium* wyosobnionych z powierzchni tusz zwierząt rzeźnych i dzików.

Wcześniejsze drobne krytyczne uwagi zawarte w recenzji mają głównie charakter porządkowy i w żadnym stopniu nie umniejszają wysokiej merytorycznej wartości wyników uzyskanych przez lek. wet. Przemysława Knysza.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. wet. Przemysława Knysza pt. „Bakterie rodzaju *Enterococcus* izolowane z tusz zwierząt rzeźnych i dziczyzny jako potencjalne zagrożenie zdrowia konsumenta” odpowiada warunkom określonym w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. nr 65 poz. 595 z późn. zm.) w zw. z art. 179 ust. 3 Ustawy z dnia 3 lipca



2018 r. z późn. zm. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r. poz. 1669).

W oparciu o przedstawioną wyżej pozytywną ocenę przedkładałam wniosek Wysokiej Radzie Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o dopuszczenie lek. wet. Przemysława Knysza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką wartość naukową pracy, a szczególnie za kompleksową w skali kraju i świata analizę występowania bakterii z rodzaju *Enterococcus* na powierzchni tusz zwierząt rzeźnych i dzików oraz wielokierunkową ocenę lekooporności szczepów *E. faecium* i *E. faecalis* przedkładałam wniosek Wysokiej Radzie Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o wyróżnienie rozprawy doktorskiej lek. wet. Przemysława Knysza.

Wrocław, 03.11.2022 r.


prof. dr hab. Jarosław Bystron