

Puławy, 02.11.2022 r.

Prof. dr hab. Jacek Osek  
Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego  
Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy  
w Puławach

**Recenzja**  
**rozprawy doktorskiej Pana lek. wet. Przemysława Knysza**  
**pt.: ”Bakterie rodzaju *Enterococcus* izolowane z tusz zwierząt rzeźnych i dziczyzny jako**  
**potencjalne zagrożenie zdrowia konsumenta”**

Podstawą formalną do wykonania recenzji jest pismo z 06 października 2022 r. Przewodniczącej Rady Dyscypliny Weterynaria, Pani prof. dr hab. Marty Kankofer, informujące o powołaniu mnie na recenzenta rozprawy doktorskiej na mocy uchwały Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 28 września 2022 r.

Bakterie z rodzaju *Enterococcus*, określane też terminem enterokoki, powszechnie występują w środowisku oraz w przewodzie pokarmowym i układzie moczowo-płciowym zwierząt i ludzi, nie powodując zwykle objawów chorobowych. Jednak spośród opisanych 60 gatunków należących do tego rodzaju, szczególnie dwa z nich: *Enterococcus faecium* i *Enterococcus faecalis* mogą być przyczyną groźnych infekcji, zwłaszcza dróg moczowych i żółciowych, zapalenia wsierdza, bakteriemii czy posocznicy. Ponadto bakterie te mogą powodować zakażenia uogólnione powstałe po zabiegach chirurgicznych, związane z zabiegami diagnostycznymi lub leczniczymi w obrębie układu moczowego a także w ranach oparzeniowych. Poważnym problemem wynikającym z tych zakażeń jest występująca u drobnoustrojów z rodzaju *Enterococcus* naturalna lub nabyta niewrażliwość na różne czynniki przeciwbakteryjne, zwłaszcza penicyliny, cefalosporyny, aminoglikozydy, ale często też na makrolidy, linkozamidy i fluorochinolony. Oporność ta jest wynikiem np. ograniczonej przepuszczalności bakteryjnych błon komórkowych w stosunku do niskiego stężenia antybiotyków aminoglikozydowych (np. streptomycyny, neomycyny) lub też, w przypadku wysokiego stężenia tych substancji, jest efektem enzymatycznej modyfikacji rybosomów czy też nabywania plazmidów lub transpozonów zawierających geny oporności. Enterokoki cechują się również wysoką tolerancją na antybiotyki zaburzające syntezę ściany komórkowej, a więc  $\beta$ -laktamy (np. cefalosporyny, karbapenemy) i glikopeptydy (np. wankomycyna). Istotną rolę w

zakażeniach ludzi szczepami *E. faecium* i *E. faecalis* mają także inne cechy, związane z obecnością czynników wirulencji, zwłaszcza substancji agregującej, cytolizyny, żelatynazy, hialuronidazy, białek Esp, EfaA, Ace i Acn oraz tzw. feromonów płciowych. Wykazano również, że czynnikiem predysponującym do wystąpienia infekcji na tle enterokoków tych dwóch gatunków jest spadek poziomu odporności, najczęściej w przebiegu ciężkich chorób układowych, transplantacji, długotrwałego leczenia szpitalnego i onkologicznego.

Wyniki licznych badań wskazują, że możliwa jest transmisja bakterii z rodzaju *Enterococcus* z przewodu pokarmowego zwierząt poddawanych ubojowi, zakażonego ale bezobjawowego personelu ubojni, czy też z zanieczyszczonych powierzchni produkcyjnych zakładu na tusze zwierząt rzeźnych a następnie na żywność pochodzenia zwierzęcego i finalnie do konsumenta. Ta droga zakażenia wynika m.in. ze zdolności enterokoków do przeżywania w niekorzystnych warunkach środowiskowych zakładów ubojowych i przetwórci mięsa, w tym do tworzenia biofilmów opornych na środki myjące i dezynfekcyjne.

W dostępnej literaturze naukowej jest stosunkowo niewiele danych dotyczących występowania bakterii z rodzaju *Enterococcus*, ze szczególnym uwzględnieniem *E. faecalis* i *E. faecium*, na powierzchni tusz zwierząt rzeźnych, a zwłaszcza zwierząt wolno żyjących pozyskiwanych w celach konsumpcyjnych. Jednakże, nawet w przypadku tych nielicznych badań, odsetek wyników dodatnich był zwykle wysoki i sięgał od 50% (tusze bydłowe) do nawet ponad 90% (tusze świń). Informacje takie, w połączeniu z opornością enterokoków na czynniki środowiskowe i ich niewrażliwością na liczne substancje przeciwbakteryjne, jak również zdolnością tych bakterii do wywoływania groźnych zakażeń ludzi, stały się istotną przesłanką i uzasadnieniem do rozpoczęcia przez Doktoranta badań nad występowaniem i charakterystyką drobnoustrojów z rodzaju *Enterococcus* na powierzchni tusz zwierząt rzeźnych i dziczyzny.

W przedstawionej do oceny pracy doktorskiej podjęto badania zmierzające do oceny występowania enterokoków w tuszach ubijanych w rzeźniach bydła, świń, królików i drobiu oraz tuszach odstrzelonych dzików, ze szczególnym uwzględnieniem dwóch gatunków najbardziej patogennych dla ludzi, tzn. *E. faecium* i *E. faecalis*. Następnie, u otrzymanych izolatów Doktorant określił fenotypowe i genotypowe cechy oporności na czynniki przeciwbakteryjne, w tym występowanie istotnych z punktu widzenia ochrony zdrowia publicznego szczepów wielolekoopornych. W ostatnim etapie badań określał też pokrewieństwo genotypowe szczepów *E. faecium* i *E. faecalis* wyizolowanych z tusz zwierząt rzeźnych oraz dzików metodą ADSRRS fingerprint (amplification of DNA fragments surrounding rare restriction sites, amplifikacja

fragmentów DNA otaczających rzadkie miejsca restrykcyjne), co ma istotne znaczenie w oznaczaniu źródeł i dróg szerzenia się tych drobnoustrojów w łańcuchu pokarmowym.

Układ ocenianej dysertacji jest zgodny z wymogami stawianymi pracom naukowym przedstawianym na stopień doktora nauk weterynaryjnych. Obejmuje ona podany na 24 stronach wstęp, zawierający przegląd piśmiennictwa, w którym Doktorant przedstawił aktualny stan wiedzy dotyczącej systematyki bakterii z rodzaju *Enterococcus*, dane dotyczące ich kompleksowej charakterystyki fenotypowej i molekularnej oraz wytwarzanych przez nie licznych czynników wirulencji. Istotną część tego rozdziału stanowią informacje dotyczące mechanizmów oporności przeciwdrobnoustrojowej dwóch najbardziej chorobotwórczych gatunków enterokoków, tzn. *E. faecium* i *E. faecalis*. Opisał również zasady i technologię uboju zwierząt rzeźnych oraz obróbkę tusz zwierząt łownych, w tym dzików i związane z tym ryzyko zanieczyszczenia mikrobiologicznego tusz i narządów zwierząt a w konsekwencji potencjalne zagrożenie dla zdrowia konsumentów. Ta kompleksowa analiza aktualnego piśmiennictwa była według mojej oceny, obok niewątpliwie cennych wskazówek Promotora, znaczącą inspiracją do podjęcia prac będących tematem pracy doktorskiej a jednocześnie świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktoranta do realizowanych badań.

W drugim rozdziale dysertacji Doktorant jasno sprecyzował powód podjęcia badań własnych, tzn. brak w dostępnej literaturze informacji dotyczących występowania i lekooporności *E. faecium* i *E. faecalis* izolowanych z tusz różnych gatunków zwierząt rzeźnych oraz dzików a także związane z nim cztery szczegółowe cele badawcze, obejmujące: określenie częstości występowania bakterii z rodzaju *Enterococcus* na powierzchni tusz; oznaczenie występowania oporności fenotypowej na antybiotyki wyizolowanych *E. faecium* i *E. faecalis*; określenie u tych bakterii obecności genetycznych markerów oporności przeciwdrobnoustrojowej; oraz ocenę pokrewieństwa genotypowego szczepów *E. faecium* i *E. faecalis* wyizolowanych z tusz poszczególnych gatunków zwierząt.

W części trzeciej rozprawy doktorskiej (Materiał i metody), na 27 stronach przedstawiono z dużymi detalami dane dotyczące wykorzystanych w badaniach tuszach zwierząt (łącznie 1 262 tusze), metodach izolacji i identyfikacji fenotypowej bakterii z rodzaju *Enterococcus*, molekularnej identyfikacji *E. faecium* i *E. faecalis*, występowania genotypowych markerów oporności na czynniki przeciwbakteryjne, oznaczania pokrewieństwa molekularnego izolatów techniką amplifikacji fragmentów DNA otaczających rzadkie miejsca restrykcyjne (ADSRRS fingerprint) jak również fenotypowej wrażliwości badanych szczepów enterokoków na szereg antybiotyków. Doktorant w swoich badaniach uwzględnił także niezbędne w tego typu analizach testy statystyczne. Opis

zastosowanych w badaniach metod nie budzi zastrzeżeń, a szczegółowa forma ich przedstawienia umożliwi ich powtórzenie oraz konfrontację z wynikami uzyskanymi przez innych autorów.

Uzyskane wyniki przedstawiono bardzo szczegółowo na 104 stronach i obejmują one formę opisową, liczne tabele i ryciny. Doktorant wykazał, że aż 1 112 (88,1%) zbadanych tusz zwierząt rzeźnych i dzików wykazywało obecność na swojej powierzchni bakterii z rodzaju *Enterococcus*, a zakres tych wyników dodatnich wynosił od 66,9% w przypadku świń do 100% w odniesieniu do dzików. Znaczący odsetek tusz był zanieczyszczonych przez enterokoki, mające istotne znaczenie dla zdrowia publicznego, zwłaszcza *E. faecalis* (łącznie 527; 47,4% spośród wyników dodatnich w kierunku *Enterococcus* spp.) a w mniejszym stopniu przez *E. faecium* (76; 6,8%). Największą częstość występowania *E. faecalis* stwierdzono na powierzchni tuszek królików; była ona statystycznie istotnie większa w porównaniu do częstości występowania tego gatunku bakterii u pozostałych badanych tusz zwierząt. Z drugiej strony, izolaty *E. faecium* dominowały u dzików lecz różnice w tej prevalencji były statystyczne jedynie w odniesieniu do powierzchni tuszek królików.

Oceniając oporność fenotypową badanych izolatów *E. faecium* i *E. faecalis* Doktorant zastosował metodę mikrorozcieńczeń oraz kryteria podane przez CSLI (penicylina, ampicylina, wankomycyna, erytromycyna, tetracyklina, gentamycyna, streptomycyna, ciprofloksacyna i enrofloksacyna), EUCAST (wankomycyna, erytromycyna, gentamycyna, streptomycyna i ciprofloksacyna) i NARMS (kanamycyna). Stwierdził, że najwięcej szczepów *E. faecalis* charakteryzowało się opornością na tetracyklinę (423 izolaty; 85,3%), erytromycynę (346; 65,6%), streptomycynę (171; 32,4%) oraz antybiotyki z grupy fluorochinolonów - ciprofloksacynę (115; 21,8%) i enrofloksacynę (114; 21,6%). Zdecydowana większość tych opornych izolatów pochodziła od zwierząt rzeźnych a tylko nieliczne z nich wyosobniono od dzików, zwłaszcza te, które wykazywały oporność na tetracyklinę. Z drugiej strony, tylko nieliczne szczepy *E. faecalis* były w pełni odporne na ampicylinę (7; 1,3%) i wankomycynę (9; 1,7%). Ta ostatnia informacja ma istotne znaczenie dla zdrowia publicznego i ewentualnego przekazywania genów oporności *van* pomiędzy enterokokami a drobnoustrojami innych gatunków.

W odniesieniu do izolatów *E. faecium*, wysoki poziom oporności dotyczył również fluorochinolonów, szczególnie enrofloksacyny (60 szczepów; 78,9%) i ciprofloksacyny (43; 56,6%) a w mniejszym stopniu tetracykliny (24; 31,6%). Takie szczepy występowały zarówno u zwierząt rzeźnych jak i u dzików. Wśród izolatów tego gatunku nie stwierdzono natomiast izolatów opornych na wankomycynę, natomiast tylko nieliczne były odporne na gentamycynę

(4 izolaty; 5,3%) i ampicylinę (6; 7,9%). W przeciwieństwie do wspomnianych wyżej *E. faecalis*, znacznie mniejszy odsetek badanych przez Doktoranta szczepów *E. faecium* wykazywał niewrażliwość na tetracyklinę (24; 31,6%), erytromycynę (14; 18,4%) oraz streptomycynę (9; 11,8%).

Następnie, na podstawie wyników oporności fenotypowej badanych szczepów enterokoków wyodrębniono izolaty, które mogły zostać zaliczone do grupy drobnoustrojów wieloopornych (MDR; multidrug resistant), tzn. cechujące się opornością na antybiotyki należące co najmniej do trzech różnych klas. Doktorant stwierdził, że 239 spośród 527 (45,3%) izolatów *E. faecalis* należało do grupy MDR i występowały one najczęściej w tuszkach królików (69,6% szczepów) oraz drobiu (42,7% izolatów). Niezwykle istotnym odkryciem był fakt, że takie szczepy były odporne na 7 (trzy szczepy z tuszek drobiowych i 10 z tuszek królików) a nawet na 9 czynników przeciwbakteryjnych (jeden izolat z tuszek królików).

Z drugiej strony Doktorant wykazał, że odsetek wieloopornych szczepów *E. faecium* był niższy niż w przypadku *E. faecalis* i wynosił ogółem 23,7% (18 izolatów) a większość z nich stwierdzana była w tuszkach drobiu (10 szczepów). Takie izolaty cechowały się też silnie rozwiniętą wieloopornością, nawet w odniesieniu do 9 (dwa szczepy) lub 10 antybiotyków (jeden izolat).

Ważnym etapem badań prowadzonych przez Doktoranta było oznaczenie genotypowych markerów oporności na badane czynniki przeciwbakteryjne. Wykazał, że oporność na tetracykliny warunkowana była w większości przez sekwencje *tetM*, *tetL*, *tetO*, chociaż ten ostatni gen nie występował u szczepów *E. faecium* wyosobnionych z tusz świń i dzików. Dalsze badania molekularne prowadzone były w kierunku identyfikacji genów: *ant(6)-Ia* (determinującego oporność na streptomycynę), *aph(3')-IIIa* (oporność na kanamycynę), *ermB* (oporność na makrolidy) oraz *vanA* i *vanB* (oporność na glikopeptydy). Doktorant stwierdził, że obecność genotypowych determinantów oporności przeciwbakteryjnej była silnie skorelowana z wykazaną przez Niego opornością fenotypową na odpowiednie antybiotyki, z wyjątkiem wankomycyny, dla której oporność badanych izolatów była determinowana przez inne czynniki niż geny *van*.

Interesującą częścią przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej jest także analiza podobieństwa genetycznego szczepów enterokoków metodą ADSRRS fingerprint. Do badań tych wybrano odpowiednio 116 izolatów *E. faecalis* i 54 izolaty *E. faecium*, pochodzące z tusz wszystkich badanych gatunków zwierząt, które cechowały się opornością na największą liczbę substancji przeciwdrobnoustrojowych. Uzyskane wyniki pozwoliły określić pokrewieństwo

molekularne takich izolatów, co w połączeniu z opornością przeciwdrobnoustrojową umożliwiło precyzyjną charakterystykę badanych izolatów enterokoków i wskazanie potencjalnych dróg szerzenia się tych bakterii od zwierząt do tusz. Takie kompleksowe badania są niewątpliwie potwierdzeniem dużej wiedzy merytorycznej i praktycznej Doktoranta i stanowią ważny pozytywny aspekt dla Jego dalszego rozwoju naukowego.

Część 5 dysertacji (Dyskusja) obejmuje 21 stron maszynopisu i jest poprawną analizą uzyskanych wyników własnych w konfrontacji z danymi piśmiennictwa. Doktorant w sposób czytelny i logiczny komentuje własne osiągnięcia, wskazuje też na znaczenie niektórych z nich, zwłaszcza związanych z opornością szczepów enterokoków na szereg czynników przeciwbakteryjnych, w tym na wankomycynę, co ma istotne znaczenie w aspekcie zagrożenia zdrowia publicznego. Potwierdza to raz jeszcze dobrą znajomość badanych zagadnień będących przedmiotem rozprawy doktorskiej.

Biorąc pod uwagę uzyskane w trakcie realizacji badań wyniki, Doktorant sformułował 13 wniosków. Wskazuje w nich na powszechne występowanie bakterii z rodzaju *Enterococcus* na powierzchni tusz zwierząt rzeźnych i dzików, zwłaszcza należących do gatunku *E. faecalis*, co może sugerować potencjalne zagrożenie zdrowia publicznego ze strony tych drobnoustrojów. Związane jest to także z wysokim poziomem oporności badanych szczepów na powszechnie stosowane antybiotyki, w tym występowaniem izolatów wieloopornych, zwłaszcza pochodzących z tuszek drobiu i królików. Interesującym wnioskiem jest stwierdzenie Doktoranta, że badanie izolowanych z tusz dzików *E. faecalis* i *E. faecium* w kierunku oporności na antybiotyki może być wykorzystane, jako metoda pomocnicza, do oceny zanieczyszczenia środowiska naturalnego tymi czynnikami przeciwdrobnoustrojowymi. Ważnym stwierdzeniem jest także konieczność prowadzenia monitoringu obecności a zwłaszcza oporności przeciwbakteryjnej *E. faecalis* i *E. faecium* na powierzchni tusz zwierząt rzeźnych i dzików a tym samym ograniczenia ich ewentualnej transmisji do dalszych etapów produkcji żywności a w konsekwencji do konsumentów.

Przedstawiona dysertacja zawiera także wymagane prawem streszczenia w językach polskim i angielskim. Cytowana literatura, obejmująca łącznie 164 pozycje w większości anglojęzycznego, aktualnego i związanego z tematem badań piśmiennictwa, jest dopełnieniem bogatej treściowo, nowatorskiej i ważnej z punktu widzenia zdrowia publicznego dysertacji doktorskiej.

Z obowiązku recenzenta chciałem też wskazać na kilka punktów, które w mojej ocenie wymagają doprecyzowania, poprawy lub nawet zmiany:

- str. 13: nazwy genów (operonów) powinny być pisane małymi literami i kursywą;

- str. 30: podanie, że próbki pobierano z tusz w rzeźniach oraz zakładach przetwórstwa dziczyzny zlokalizowanych na obszarze Polski jest nieściśle, gdyż podmioty te, jak podano na stronie dalej, były położone na terenie południowo-wschodniej Polski a zakład rozbioru dziczyzny był tylko jeden;
- str. 42: zamiast prędkości wirowania lepiej podać wartość przyspieszenia  $g$  a termin pellet zastąpić słowem osad;
- str. 44: należy rozwinąć wprowadzony po raz pierwszy skrót EURL-AR;
- str. 47: termin „próba” należy zamienić na „próbka”;
- Tabela 4.23: nie ma potrzeby podawania, że żaden z izolowanych szczepów enterokoków był odporny na 7 grup antybiotyków a zwłaszcza, w przypadku braku izolatów opornych wskazywanie, że jest to „0” procent; dotyczy to również danych w innych tabelach
- str. 183, wniosek 5: nie wiem czy wysunięty stwierdzenie o powszechnym stosowaniu antybiotyków w chowie zwierząt jest podparte jakimiś badaniami prowadzonymi przez Autora?

Powyższe uwagi wynikają jednak w większości z dociekliwości recenzenta i nie rzutują w żaden sposób na wartość merytoryczną ocenianej dysertacji. Stanowi ona oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego, jak również wykazuje ogólną wiedzę Doktoranta i umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

Reasumując stwierdzam, że przedłożona do recenzji dysertacja doktorska Pana lek. wet. Przemysława Knysza pt. "Bakterie rodzaju *Enterococcus* izolowane z tusz zwierząt rzeźnych i dziczyzny jako potencjalne zagrożenie zdrowia konsumenta" odpowiada warunkom określonym w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595, z późn. zm.), w związku 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). Upoważnia mnie to do przedłożenia Radzie Dyscypliny Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosku o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pana lek. wet. Przemysława Knysza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie mając na uwadze wysoką nowatorskość, wartość merytoryczną, szeroki zakres wykonanych badań oraz ich staranność wnioskuję o wyróżnienie Pana lek. wet. Przemysława Knysza stosowną nagrodą.