

RECENZJA

rozprawy doktorskiej lek. wet. Przemysława Błaszczyka pt. „Charakterystyka i epidemiologia szczepów *Streptococcus uberis* wyizolowanych z mleka krów chorych na zapalenie wymienia”.

Oceniana rozprawa została wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Katedry Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie pod kierunkiem dr hab. Marioli Bochniarz. Podstawą do sporządzenia recenzji jest Uchwała nr 16/2025 Rady Dyscypliny Weternaria z dnia 4. 12. 2025.

Zapalenie gruczołu mlekowego (*mastitis*) jest jedną z najczęstszych i powodujących największe straty ekonomiczne chorób bydła mlecznego. Wyniki badań przeprowadzonych w różnych krajach wskazują, że stany zapalne wymienia (w postaci klinicznej oraz subklinicznej) mogą występować nawet u 31–71% tych zwierząt. Straty ekonomiczne spowodowane przez *mastitis* związane są z kosztami diagnostyki i leczenia zakażeń, brakowaniem zwierząt, spadkiem produktywności mlecznej, pogorszeniem jakości mleka oraz ryzykiem rozwoju innych chorób. Zapalenie gruczołu mlekowego u bydła jest nie tylko problemem hodowców tych zwierząt i producentów mleka, ale ma także ogromne znaczenie dla zdrowia publicznego. Wiele drobnoustrojów powodujących *mastitis* jest potencjalnymi patogenami człowieka, a powszechne stosowanie chemioterapeutyków w profilaktyce i leczeniu tych zakażeń przyczynia się do narastania problemu antybiotykooporności wśród bakterii. Coraz powszechniej postulowana konieczność ograniczania stosowania antybiotyków u zwierząt, od których pozyskuje się produkty spożywcze dla człowieka, sprawia, że niezbędne stają się nowe programy profilaktyczne i terapeutyczne zapalenia gruczołu mlekowego u bydła. Niezwykle istotne jest też ciągle monitorowanie wrażliwości drobnoustrojów powodujących *mastitis* na rutynowo stosowane preparaty przeciwdrobnoustrojowe.

Wprowadzenie programów kontroli zapalenia wymienia u bydła oraz bardziej rygorystyczne przestrzeganie zasad bioasekuracji pozwoliło na znaczne ograniczenie lub wręcz wyeliminowanie klasycznych patogenów wymienia powodujących tzw. *mastitis*

zakaźne (jak np. *Staphylococcus aureus* czy *Streptococcus agalactiae*). W wielu krajach obserwuje się natomiast wyraźny wzrost częstości izolacji bakterii powodujących *mastitis* środowiskowe, zwłaszcza *Streptococcus uberis* i gronkowców koagulazoujemnych. Według danych literaturowych, paciorkowce powodują obecnie 40-50% przypadków *mastitis*, a *S. uberis* jest wśród nich najczęstszą przyczyną, stanowiąc nawet ponad 60% izolatów tej grupy bakterii.

Biorąc pod uwagę powyższe, podjęcie przez lek. wet. Przemysława Błaszczyka badań mających na celu poznanie sytuacji epidemiologicznej zakażeń *S. uberis* u bydła mlecznego, określenie potencjalnych czynników zoohigienicznych sprzyjających takim zakażeniom oraz ocenę fenotypową i genotypową wrażliwości tej bakterii na antybiotyki uważam za niezwykle ważne i celowe.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska w obejmuje 100 stron tekstu, a jej układ jest zgodny z ogólnie przyjętymi normami redakcyjnymi. W tekście wyróżniono główne rozdziały: Wstęp, Cele pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski oraz liczące 201 pozycji Piśmiennictwo. Tekst pracy uzupełniają streszczenia w języku polskim i angielskim oraz wykaz zastosowanych przez Autora skrótów. Rozprawa została napisana w poprawnym stylu, a poszczególne omawiane zagadnienia przedstawiono w logicznej kolejności oraz w jasny i zwięzły sposób. We Wstępie Doktorant przedstawił ogólną charakterystykę zapalenia gruczołu mlekowego u bydła oraz wywołujących go drobnoustrojów, ze szczególnym uwzględnieniem znaczenia chorobotwórczego *Streptococcus uberis*. Duża część tego rozdziału poświęcona została procesom zapalnym i immunologicznym w gruczole mlekowym objętym zakażeniem, zwłaszcza roli cytokin oraz białek ostrej fazy, a także molekularnym mechanizmom oporności bakterii na antybiotyki. Omawiając te zagadnienia, Autor umiejętnie cytuje liczne pozycje literaturowe, co świadczy o dobrej znajomości patogenezы zapalenia wymienia a także problemów związanych z narastającą antybiotykoopornością drobnoustrojów. Jest jednak kilka uwag oraz kwestii wymagających wyjaśnienia:

1/ *Streptococcus uberis* został przez Autora zakwalifikowany do paciorkowców ropotwórczych w obrębie grup CGS/GGS wg klasyfikacji Lancefield (nie Lancefielda!). Tymczasem gatunek ten zazwyczaj nie posiada wielocukru C (i nie da się grupować) lub (rzadko) posiada wielocukier odpowiadający grupie E.

2/ Zdolność paciorkowców do wywoływania określonego typu hemolizy już dawno przestała być „niezwykle ważnym kryterium klasyfikacji *Streptococcus* sp.” Wiadomo, że niektóre

gatunki tego rodzaju mogą dawać 2 różne (lub nawet wszystkie 3) typy hemolizy w zależności od szczepu i warunków inkubacji.

3/ Stwierdzenie że „*S. uberis* jest powszechnie występującym w środowisku patogenem” nie jest do końca zgodne z prawdą. Sugeruje on bowiem, iż drobnoustrój ten występuje, np. w glebie czy wodzie, jako saprofit i niezależnie od gospodarza zwierzęcego. Tymczasem miejscem jego bytowania może być otoczenie zwierząt, np. ściółka, ale trafia tam z wydzielinami i wydaliniami i może stosunkowo łatwo przeżywać.

4/ *tetM* oraz *tetO* to geny kodujące tzw. białka chroniące rybosomy (*ribosome protecting proteins* – RPPs), a nie powodujące „punktową mutację rRNA”. Ponadto, zmiana w obrębie rRNA nie byłaby dziedziczna. Żadna z cytowanych w tym kontekście publikacji nie wspomina o tej „mutacji”.

Z uwagi na fakt, że zapobieganie i leczenie *mastitis* u bydła powodowanego przez *S. uberis* będzie w coraz mniejszym stopniu polegało na stosowaniu antybiotyków (konieczna będzie racjonalna antybiotykoterapia – tylko w określonych przypadkach, przy użyciu ograniczonej liczby preparatów i na podstawie wykonanego wcześniej testu wrażliwości), a w coraz większym na poprawie warunków zoohigienicznych i różnych formach terapii alternatywnych, głównymi celami przeprowadzonych przez Doktoranta badań było określenie sytuacji epidemiologicznej zakażeń *S. uberis* u bydła w Województwie kujawsko-pomorskim oraz wpływu różnych czynników mających wpływ na zdrowotność bydła mlecznego, w tym terapii w okresie zasuszenia, szczepionek przeciwbakteryjnych oraz dezynfekcji przed- i poudojowej na częstość występowania zakażeń *S. uberis*. Wyizolowane szczepy tego gatunku bakterii zostały również scharakteryzowane pod względem wrażliwości na antybiotyki najczęściej stosowane w leczeniu *mastitis* oraz występowania w ich materiale genetycznym genów oporności na antybiotyki β -laktamowe, tetracykliny, makrolidy, aminoglikozydy i linkozamidy. Dodatkowym celem przeprowadzonych badań była ocena nasilenia reakcji zapalnej u krów z *mastitis* wywołanym przez *S. uberis* poprzez pomiar stężenia surowiczego amyloidu A oraz cytokin: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 β oraz TNF- α .

Analizując rozdział 3. (Materiały i metody) ocenianej dysertacji, należy stwierdzić, że badania przeprowadzone zostały przy użyciu właściwie dobranych metod badawczych. Warto podkreślić jest to, że Doktorant umiejętnie łączy klasyczne techniki mikrobiologiczne z nowoczesnymi metodami identyfikacji drobnoustrojów, takimi jak technika MALDI-ToF czy metody molekularne. Na uznanie zasługuje dokładne opisanie przez Doktoranta kryteriów interpretacji wyników badań wrażliwości na antybiotyki metodą dyfuzyjno-krażkową.

Dowodzi to nie tylko dobrej znajomości samej metody, ale też jej ograniczeń, jako że dla większości antybiotyków stosowanych w leczeniu *mastitis* u bydła nie ma ustalonych wartości „breakpoint” i uzyskane wyniki uzyskane *in vitro* mogą nie być miarodajne. Ogółem, do badań pobranych zostało 194 próbki mleka od krów wykazujących podwyższoną zawartość komórek somatycznych (tj., dodatnich w teście TOK). Badane zwierzęta pochodziły z 28 gospodarstw, w których stosowano różne systemy utrzymania oraz doju krów, a także zróżnicowanych pod względem stosowanych zabiegów profilaktycznych (szczepienia, pre- i/lub postdipping) oraz leczniczych (terapia antybiotykowa w okresie zasuszenia). Z pobranych próbek mleka Doktorant izolował 176 szczepów bakteryjnych, w tym 30 izolatów *S. uberis*. Chociaż celem ocenianej rozprawy była charakterystyka szczepów jedynie tej bakterii, to wydaje się, że wyszczególnienie (np. w formie załącznika) pozostałych izolowanych gatunków drobnoustrojów pozwoliłoby lepiej poznać sytuację epidemiologiczną w poszczególnych gospodarstwach oraz wpływ ocenianych czynników zoohigienicznych oraz zabiegów profilaktyczno-leczniczych na stan zdrowotny zwierząt.

Moje uwagi i pytania dotyczące tej części dysertacji są następujące:

1/ Informacja tym, że 194 próbki mleka oraz krwi pobrano od krów dodatnich w teście TOK powinna znaleźć się już w podrozdziale 3.1.1. Czytający byłby od razu zorientowany, według jakich kryteriów pobierano materiał do badania.

2/ Określenia „całkowicie wymieszana dawka żywieniowa” oraz „częściowo wymieszana dawka żywieniowa” są nieprecyzyjne, gdyż sugerują, że obie dawki różnią się jedynie stopniem (dokładnością) wymieszania składników. W rzeczywistości różnice dotyczą składu paszy.

3/ Zgodnie z informacją zawartą w podrozdziale 3.1.4 najpierw pobierano mleko z TOK-dodatnich ćwiartek wymienia, a następnie „z dalszego postępowania wykluczono krowy (...) w zasuszeniu”. Czy rzeczywiście taka była kolejność postępowania?

4/ Terminy „wysoka linia” czy „3 kany” (chodzi o systemy doju w poszczególnych gospodarstwach) nie są często (o ile w ogóle) spotykane w literaturze. Wymagają one wyjaśnienia.

5/ W podrozdziale 3.2.4 brakuje nazwy producenta podłoża CHROMagar Mastitis.

6/ Czy ocena „stopnia czystości” krów była przeprowadzana według uznanych i opisanych standardów, czy była oceną subiektywną? Brakuje albo odniesienia do odpowiedniej pozycji literaturowej, albo przedstawienia kryteriów tej oceny.

W kolejnej części dysertacji lek. wet. Przemysław Błaszczyk opisuje uzyskane przez siebie wyniki. Oceniając wpływ czynników zoohigienicznych oraz stosowanych zabiegów profilaktycznych i leczniczych, Doktorant stwierdził, że relatywnie niższa częstość zakażeń *S. uberis* miała miejsce w tych stadach, w których stosowano selektywną terapię antybiotykową w okresie zasuszenia i szczepienia profilaktyczne przeciwko *mastitis* (szczególnie skuteczny okazał się preparat Ubac®, gdyż Doktorant wykazał jedynie 3 przypadki zakażeń *S. uberis* w 7 gospodarstwach, o łącznej obsadzie 346 krów, stosujących ten typ profilaktyki swoistej), a także w stadach utrzymujących wyższy poziom czystości zwierząt. Natomiast nieco zaskakującym okazał się fakt, iż w stadach stosujących przed- i poudojową dezynfekcję strzyków stwierdzono wyższy odsetek zakażeń *S. uberis* (w przeliczeniu na 1 krowę) niż w tych, gdzie takiej dezynfekcji nie było wcale. Jako prawdopodobną przyczynę Autor uznał niewłaściwą technikę dezynfekcji, polegającą na zanurzaniu strzyków w tym samym pojemniku ze środkiem dezynfekcyjnym. Jednak wobec braku odpowiednich badań porównawczych rzeczywiste znaczenie tego czynnika jest trudne do oceny. Dotyczy to także innych ocenianych parametrów. Na występowanie na danej fermie określonego patogenu powodującego *mastitis*, w tym *S. uberis*, wpływ ma wiele współistniejących czynników, również takich, które nie były poddane analizie porównawczej w ocenianej rozprawie, jak np. zakażenia innymi drobnoustrojami, skuteczność dezynfekcji urządzeń udojowych, system i częstotliwość wymiany ściółki, itp. Przykładowo, w badaniach przeprowadzonych przez Doktoranta nie było takiej sytuacji, aby w stadach bydła mlecznego, w których stosowano szczepienia, nie stosowano równocześnie terapii DC. Dodatkowo, w ponad połowie tych stad zwierzęta utrzymywane były w dobrych warunkach zoohigienicznych (1. lub 2. stopień czystości krów). Nie jest więc możliwa miarodajna ocena wpływu poszczególnych tych czynników na częstość zakażeń *S. uberis*. Podobnie, z większą ostrożnością należałoby interpretować wyniki zależności między częstością izolacji *S. uberis* a liczbą komórek somatycznych w mleku zbiorczym – wzrost liczby komórek somatycznych wynika przecież także z zakażeń innymi drobnoustrojami.

Druga grupa badań przeprowadzonych w ramach ocenianej dysertacji dotyczyła stężenia wybranych markerów odpowiedzi immunologicznej i stanu zapalnego w mleku oraz surowicy krów ze stwierdzonym zapaleniem wymienia spowodowanym przez *S. uberis*. Doktorant wykazał istotny wzrost stężenia wszystkich badanych parametrów, tj. amyloidu A, interleukiny 1 β , 6, 8 oraz 12 β , a także TNF- α , w mleku zwierząt zakażonych, a także spadek tych wartości w surowicy, co świadczy o znacznej mobilizacji układu immunologicznego w zakażonym gruczole mlekowym oraz przechodzeniu komórek zapalnych z krwi obwodowej.

Badania oporności fenotypowej i genotypowej izolatów *S. uberis* stanowią w mojej opinii największą wartość ocenianej rozprawy, mając jednocześnie duże znaczenie aplikacyjne. Z uwagi na narastającą oporność bakterii na chemioterapeutyki, istnieje konieczność ciągłego monitorowania tego zjawiska wśród izolatów klinicznych. Przeprowadzone przez Doktoranta badania wykazały często występującą oporność *S. uberis* na tetracykliny, erytromycynę i linkomycynę, a także, co jest szczególnie niepokojące w kontekście terapii *mastitis* u bydła, przypadki oporności na antybiotyki β -laktamowe – penicylinę i cefalosporyny. Sposób przedstawienia tych wyników nie budzi większych zastrzeżeń, z wyjątkiem opisu częstości występowania poszczególnych genów warunkujących oporność na antybiotyki. Autor podaje przykładowo iż „łącznie stwierdzono obecność 36 genów” oraz „najczęściej występowały geny *tet* odpowiedzialne za oporność na tetracykliny: 12 genów *tetL*, 10 genów *tetM* oraz 3 geny *tetO*”. Sumowanie wszystkich (lub poszczególnych grup) genów oporności u wszystkich badanych izolatów wprowadza czytelnika w błąd; w rzeczywistości stwierdzono 7 rodzajów genów (spośród 11 badanych), a geny *tetL*, *tetM* oraz *tetO* występowały w materiale genetycznym, odpowiednio, 12, 10 i 3 izolatów.

W rozdziale 5. (Dyskusja) Doktorant omawia uzyskane przez siebie wyniki i umiejętnie konfrontuje je z danymi literaturowymi. Dobór piśmiennictwa jest ściśle związany z tematyką badań i dowodzi dobrej znajomości analizowanych zagadnień. Moje uwagi dotyczące tego rozdziału są następujące:

1/ W zdaniu na stronie 63, dotyczącym miejscowej reakcji zapalnej w gruczole mlekowym zakażonym *S. uberis*, Doktorant odnosi się do wyników badań własnych, cytując jednocześnie innych autorów. Jest to logicznie sprzeczne.

2/ Skąd wiadomo, że próbki krwi i mleka pobierano w „początkowej fazie zapalenia” wymienia? (Strona 64). Do jakiego momentu trwania infekcji można mówić o „fazie początkowej”?

W podsumowaniu rozprawy doktorskiej Autor zawarł 11 wniosków. W opinii recenzenta, nie wszystkie z nich są uzasadnione, a niektóre wymagają przeredagowania. Przykładowo, wniosek nr 3 nie może odnosić się tylko do *S. uberis*. Wzrost stężenia amyloidu A będzie miał miejsce przy każdym zapaleniu gruczołu mlekowego, niezależnie od rodzaju drobnoustroju powodującego infekcję. Autor sam podaje wcześniej, że białka ostrej fazy są „wysoce czułymi, aczkolwiek nieswoistymi wskaźnikami procesu zapalnego” oraz że inni autorzy wykazali wyższe poziomy amyloidu A w *mastitis* powodowanym przez

Staphylococcus aureus. Z kolei wnioski nr 5 i 7 dotyczą w zasadzie tego samego i mogłyby być scalone w jeden. Wniosek nr 10 w swej obecnej postaci nie odpowiada wynikom badań (zgodnie z nimi, więcej szczepów *S. uberis* izolowano ze stad, gdzie stosowano terapię DC, bo aż 21, a tylko 9 ze stad bez terapii w okresie zasuszenia) i powinien być przeredagowany. Jak wspomniano poprzednio, w opisanym układzie doświadczalnym nie da się raczej rozpatrywać oddzielnie i niezależnie od siebie takich parametrów jak stosowanie szczepień, terapii DC, pre- i postdippingu oraz określanie stopnia czystości zwierząt, w związku z tym wnioski nr 8, 9, 10 i 11 muszą być formułowane z nieco większą ostrożnością. Ponadto, wniosek nr 11 jest nie do końca jasny. O jaki odsetek szczepów *S. uberis* chodzi? Czy względem innych izolowanych drobnoustrojów czy badanych zwierząt? Uważam też, że wniosek ten należałoby zawęzić tylko do preparatu Ubac®, gdyż inne oceniane szczepionki (w tym Mastibiovac®, również zawierająca antygen *S. uberis*) nie okazały się tak skuteczne.

Ocena końcowa

Powyższe uwagi nie umniejszają w sposób znaczący walorów poznawczych i aplikacyjnych pracy, jednak powinny być uwzględnione przy przygotowywaniu dalszych etapów postępowania doktorskiego oraz ewentualnej publikacji. Oceniana rozprawa doktorska została zaplanowana i zrealizowana w sposób skrupulatny i kompleksowy, a uzyskane wyniki mogą być bardzo przydatne a punktu widzenia opracowanie strategii ograniczania zakażeń *S. uberis* u bydła. **Biorąc powyższe pod uwagę, stwierdzam, iż rozprawa doktorska lek. wet. Przemysława Błaszczyka pt. „Charakterystyka i epidemiologia szczepów *Streptococcus uberis* wyizolowanych z mleka krów chorych na zapalenie wymienia” odpowiada warunkom określonym w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zmianami) i wnioskuję o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Jerzy Ksiol