

prof. dr hab. Dariusz Bednarek
Dział Bakteriologii i Chorób Bakteryjnych Zwierząt
Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy
w Puławach

OCENA

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

przygotowanej w Zakładzie Mikrobiologii Katedry Przedklinicznych Nauk
Weterynaryjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie
pod kierunkiem **dr hab. Marioli Bochniarz, prof. uczelni**

Praca dotyczy ważnego i stale utrzymującego się w populacji bydła mlecznego w kraju i zagranicą problemu zapaleń gruczołu mlekowego krów wywoływanych przez paciorkowce spośród których *Streptococcus uberis* uważa się obecnie za wiodący czynnik zakaźny o środowiskowym charakterze wywołującym zwłaszcza kliniczne, jak również subkliniczne formy *mastitis*.

W klasycznym ujęciu drobnoustroje wywołujące *mastitis* u krów, a opisano ich dotychczas już ponad 150 różnych gatunków głównie bakterii (90 %) ale też mykoplazm, wirusów, grzybów i pleśni można podzielić dwojako. Pierwszy podział uwzględnia udział drobnoustrojów w rozwoju zmian zapalnych wymienia pod kątem ich przebiegu i stopnia nasilenia dzieląc je na tzw. *major* oraz *minor pathogens*. Do pierwszej z tych grup (*major pathogens*) zalicza się właśnie ***Streptococcus uberis*** - stanowiący przedmiot zainteresowań Doktoranta oraz dwa pozostałe ważne w patogeniezie *mastitis* gatunki paciorkowców tj. *S. agalactiae* i *S. dysgalactiae*, a także stosunkowo groźny, zważywszy na jego oportunistyczny i zoonotyczny charakter *Staphylococcus aureus* oraz bakterie Gram-ujemne (*Coliforms*) i *Trueperella pyogenes* (dawn. *Corynebacterium pyogenes*, *Actinomyces pyogenes*, *Arcanobacterium pyogenes*). Z kolei do grupy - *minor pathogens* wchodzi m.in.: cieszące się obecnie dużym zainteresowaniem licznych ośrodków naukowych na świecie gronkowce koagulazo-ujemne (CNS) oraz mikrokoki, *Corynebacterium bovis*,

a także grzyby drożdżopodobne.

Drugi podział, który w znacznym stopniu upraszcza tą nieco skomplikowaną procedurę różnicującą rodzaj patogenów wywołujących *mastitis*, szczególnie przydatny w warunkach terenowych, uwzględnia kryterium ich zakaźności. Wg tego założenia drobnoustroje wywołujące *mastitis* u krów dzielimy na bezwzględnie zakaźne, to jest te, które zwykle kolonizują gruczoł mlekowy krowy i mogą rozprzestrzeniać się przez sprzęt udojowy i obsługę zwierząt oraz te tzw. środowiskowe, które normalnie nie zakażają tkanek gruczołu mlekowego (szczególnie jego głębszych warstw) poprzez kanał strzykowy, ale gdy środowisko, strzyki oraz skóra wymienia (często z mikro urazami na powierzchni), a także sprzęt udojowy są zanieczyszczone tymi drobnoustrojami, mogą one za ich pośrednictwem dostać się do światła kanału strzykowego poprzez jego otwarte ujście (zwłaszcza w stanach rozluźnienia m. zwieracza strzyku) rozprzestrzeniając się dalej do zatoki strzykowej oraz zatok mlecznych zakażając ostatecznie całą ćwiartkę wymienia.

Wspomniane drobnoustroje zakaźne, a wśród nich *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus. agalactiae*, *Mycoplasma bovis* i *Corynebacterium bovis* przenoszone są z zajętej ćwiartki wymienia krowy do niezakażonej, a zasadniczym źródłem czynnika zakaźnego jest zwykle wydzielina zapalna z zakażonych ćwiartek. Drobnoustroje te przenoszone są najczęściej podczas doju poprzez kubki strzykowe, ręce dojarza, a także niestety dość często jeszcze przez zanieczyszczone ręczniki/gąbki do pielęgnacji i oczyszczania skóry wymion, jeśli są one używane wielokrotnie podczas doju pomiędzy różnymi osobnikami w stadzie.

W przypadku zaś patogenów środowiskowych, takich jak *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia* sp., *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp. oraz inne Gram-ujemne bakterie, ponadto *T. pyogens*, CNS, środowiskowe paciorkowce, drożdże, grzyby pleśniowe i glony bezchlorofilowe - *Prototheca*, przeciwdziałanie ich zakażeniom jest dość złożone bo trzeba pamiętać, że są to drobnoustroje ubikwitarne - stale obecne w otoczeniu krowy (woda, ściółka, kał) i stąd ich pełna eliminacja jest niemożliwa. Konieczny jest więc ciągły nadzór nad czystością i higieną krów w stadzie, zwłaszcza podczas doju (doić tylko „suche wymię”) oraz prowadząc stałą kontrolę stanu czystości legowisk, wybiegów (usuwanie błota, nawozu) i wszelkich pomieszczeń dla zwierząt (monitorowanie w nich temp. i wilgotności, rozwoju populacji much). Jest to szczególnie konieczne w okresach zwiększonego namnażania się tych patogenów w środowisku hodowlanym

np. w sezonie letnim gdy przy sprzyjających warunkach mikroklimatycznych w oborze, wynikających m.in. ze wzrostu temperatury i wilgotności w pomieszczeniach inwentarskich pojawiają się odpowiednie warunki do niekontrolowanego namnażania się zarazków i wzrostu ich presji zakaźnej. Typowym przykładem takiego sezonowego nasilenia przypadków *mastitis* u krów jest tzw. „letnie zapalenie wymienia” wywoływane przez *T. pyogenes*. W tym miejscu należy dodać, że w przedstawionej wyżej klasyfikacji dwa gatunki paciorkowców odbiegają nieco od przedstawionego wcześniej sztywnego schematu tj. **paciorkowiec wymieniowy - *S. uberis***, który jako przedmiot badań Doktoranta będzie szerzej omówiony, oraz *S. dysgalactiae* oba mają bowiem cechy zarówno patogenu zakaźnego, jak i środowiskowego.

S. uberis jest typowym drobnoustrojem ubikwitalnym szeroko obecnym w środowisku fermy często na skutek pierwotnego zanieczyszczenia pomieszczeń inwentarskich (kałem, śliną i wydzieliną z nozdrzy) przez krowy, u których ten mikroorganizm bytuje w żwaczu, pochwie, zewnętrznych narządach płciowych, jamie ustnej oraz na skórze wymienia i strzyków. Niedokładne czyszczenie i przygotowanie wymienia do doju sprzyja *mastitis* na tle *S. uberis*, a także innych patogenów środowiskowych. Jest to najszerzej rozpowszechniony środowiskowy *Streptococcus* sp., związany najczęściej z klinicznymi przypadkami *mastitis* chociaż stany podkliniczne nie są również odosobnione. Większość infekcji pojawia się w okresie wczesnej laktacji lub późnego zasuszenia, chociaż brak terapii u krowy zasuszonej sprzyja wcześniejszej infekcji podczas okresu zasuszenia. Rany i popękania skóry strzyków sprzyjają kolonizacji takiej skóry przez *S. uberis* i zwiększają ryzyko infekcji. Uważa się, że większość infekcji pojawia się zimą, jednak okres lata sprzyja namnażaniu się bakterii, wzrostu ich koncentracji w środowisku hodowlanym i zwiększeniu presji zakażeń. Zakażenia dotyczą raczej starszych krów wieloródek niż młodszych w okresie pierwszej lub drugiej laktacji.

Dotychczasowe dostępne dane literaturowe, a ich niektóre aspekty omówione również w ocenianym opracowaniu, w mniej lub bardziej wyczerpujący sposób przedstawiają rolę *S. uberis* w epidemiologii i etiopatogenezie *mastitis* u bydła, jednak nadal jest w tej kwestii dużo niedomówień, a nawet sprzecznych opinii. Zważywszy na te braki i pewne źródłowe sprzeczności interpretacyjne, zwłaszcza z zakresu lokalnej epidemiologii *mastitis* na tle zakażeń *S. uberis*, które mogą zdecydowanie różnić się, a nawet podlegać istotnym zmianom w porównaniu z

dotychczasowym przyjętym stanowiskiem, nowo podejmowane badania z tego zakresu w wybranych krajach europejskich i ich regionach mają pełne uzasadnienie naukowe.

Doktorant podjął się również takiego ambitnego zadania badawczego realizowanego w przewodzie doktorskim, którego celem było ocenić częstotliwość występowania *S. uberis* w krajowych stadach krów mlecznych (w sumie 28 stad) zlokalizowanych na terenie woj. kujawsko-pomorskiego. Ważnym aspektem w Jego badaniach, zwłaszcza z bioasekuracyjno-prognostycznego punktu widzenia było zbadanie zależności pomiędzy poziomem opieki zoohigienicznej wyrażonej stopniem czystości krów w stadzie (I, II, III i IV), a odsetkiem izolacji szczepów *S. uberis*. Warto podkreślić również, że wyjątkowo cennym elementem pracy Doktoranta wchodzącym w zakres badań podstawowych, była też ocena natężenia odpowiedzi immunologicznej u krów chorych na zapalenie wymienia wywołane przez *S. uberis*. Badania te obejmowały całą gamę racjonalnie dobranych reprezentatywnych wskaźników analizowanych zarówno w mleku, jak i w surowicy krwi zwierząt takich jak, surowiczy amyloid A (SAA), tj. szczególnie indykatorowe dla bydła bof oraz typowe dla przebiegu procesu zapalnego prozapalne cytokiny, tj. IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 β i TNF- α . Należy również docenić wkład Doktoranta w badaniach stanowiących nie mniej ważną część Jego pracy doktorskiej, a dotyczących ustalenia fenotypowych profili lekowrażliwości *S. uberis* na antybiotyki rutynowo stosowane w terapii *mastitis*, wpisując się tym samym w wielowątkowy nurt badań nad problemem narastania lekooporności w leczeniu zarówno ludzkim, jak i weterynaryjnym oraz prób jego przeciwdziałania. Uzyskane wyniki w tym zakresie są wyjątkowo pożądane nie tylko z naukowego punktu widzenia ale posiadają one też niepodważalne walory aplikacyjne. Doktorant oceniał bowiem antybiotyki najczęściej stosowane obecnie w leczeniu *mastitis* u krów, tj. penicylinę, cefaleksynę, cefoperazon, cefquinom, ceftiofur, tetracyklinę, erytromycynę oraz linkomycynę. Pogłębił je również dodatkowymi nowatorskimi badaniami obejmującymi szczegółową analizą molekularnych determinantów lekooporności szczepów *S. uberis* wywołujących zapalenie wymienia u krów.

Przedstawione wyżej cele badawcze pracy i jej założenia zrealizował Doktorant w oparciu o badania wykonane w warunkach terenowych, a uzyskane rezultaty wraz z ich omówieniem i wnioskami zaprezentował w formie oryginalnego opracowania stanowiącego rozprawę doktorską. Przedłożona do recenzji praca

doktorska przygotowana jako „manuskrypt książki” (zgodnie z wytycznymi Ustawy: *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* z dn. 20 lipca 2018 r. art. 187; Dz.U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.) ma układ typowy dla tego typu opracowań i liczy w sumie 100 stron maszynopisu. Zawiera ona kolejno: stronę tytułową, podziękowania, oświadczenia opiekuna naukowego pracy i autora, spis treści, wykaz przyjętych skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp, cel i hipoteza badawcza, materiał i metody, wyniki badań, dyskusję, wnioski oraz piśmiennictwo (liczące 201 pozycji na 21 stronach). Zasadnicza dokumentacja wyników badań przedstawiona została natomiast w postaci 16 oddzielnych tabel (przy czym pierwszą z nich oznaczono jako Tab.1a i Tab.1b) oraz 7 rycin (Fig. 1-5 oraz Ryc.1-2) wkomponowanych bezpośrednio w tekst rozprawy

Tytuł przedstawionej do recenzji dysertacji doktorskiej odzwierciedla zasadnicze założenia pracy, a jej kilkupunktowe rozwinięcie w rozdziale: „Cel i hipoteza badawcza” bardziej szczegółowo to ogólne założenie precyzuje co zostało już omówione wyżej w tym opracowaniu. Można jednak rozwinąć nieco sam aspekt celowości obserwacji wpływu szczepień przeciwko zakażeniom *S. uberis*, roli pre- i postdippingu oraz stosowania antybiotyków DC na status epizootyczny ocenianych stad krów w zakresie badanego patogenu zwłaszcza, że Doktorant w zasadzie nie wyeksponował tego celu w opisie pracy, a finalnie omówił go dość szczegółowo pod kątem otrzymanych rezultatów i sformułowanych wniosków. Należy przyjąć, że te dodatkowe elementy/obserwacje realizowane były w ramach jednego wyspecyfikowanego celu obejmującego wpływ określonych warunków zoohigienicznych na poziom izolacji *S. uberis*.

Wstęp pracy dość obszernie, bo aż na 19 stronach maszynopisu, wprowadza w sposób usystematyzowany i przejrzysty w problem udziału zakażeń *Streptococcus* spp. a zwłaszcza *S. uberis* w zapaleniach wymienia u krów, omawia szczegółowo najważniejsze aspekty etiopatogenezy tej choroby oraz charakter zmian zapalnych pod kątem udziału prozapalnych cytokin i markerów odpowiedzi ostrej fazy. Ważną częścią tego rozdziału jest też przedstawienie tła historycznego i aktualnej sytuacji dotyczącej problemu lekooporności w leczeniu zarówno ludzkim, jak i weterynaryjnym, a zwłaszcza szybkiego rozprzestrzeniania się w ostatnich dekadach bakterii wielolekoopornych odpowiedzialnych również za notowane coraz częściej na tym tle przypadki *mastitis* u krów. Doktorant w tym rozdziale omówił szczegółowo mechanizmy oporności bakterii oraz zastosowanie różnych grup antybiotyków w

terapii *mastitis* z oceną ich efektywności. W rozdziale tym zwrócono też uwagę na ważny aspekt szerszego upowszechniania w lecznictwie zwierząt lansowanej obecnie koncepcji „One Health – Jedno zdrowie” jako realnego sposobu na efektywne ograniczanie stosowania antybiotyków w terapii - racjonalizując ich zużycie np. poprzez zastosowanie wyłącznie terapii celowanej poprzedzonej wnikliwą kontrolą zasadności użycia określonych środków przeciwbakteryjnych w poszczególnych przypadkach klinicznych.

Warto podkreślić, że wstęp napisano dość obszernie eksponując zwłaszcza znaczenie paciorkowców w etiopatogenezie *mastitis* u bydła wraz z wiodącą rolą markerów zapalenia w tym procesie, a rozdział ten opracowano z dużą dbałością o jego warstwę merytoryczną odnosząc się w tekście w większości do aktualnego piśmiennictwa. Świadczy to o dobrym przygotowaniu teoretycznym i bieżącej wiedzy Doktoranta w tym zakresie, również co do ogólnie przyjętych zasad publikowania prac naukowych, znajomości aktualnego piśmiennictwa i tendencji bibliograficznych oraz dużych umiejętności we właściwym doborze cytowanych pozycji.

Część doświadczalna opiniowanej rozprawy doktorskiej rozpoczyna się jednostronicowym rozdziałem zatytułowanym: „Cel i hipoteza badawcza”, w którym wyartykułowano ogólne założenie mające na celu zbadanie charakterystyki *S. uberis* jako czynnika etiologicznego *mastitis* u krów realizowanego poprzez 5-punktowy szereg zadań (celów) szczegółowych. Zważywszy jednak na sformułowane w pracy wnioski (nr 9-11) obejmujące: wpływ procedur pre- i postdippingowych, terapii DC i szczepień na częstotliwość izolacji badanego patogenu, w dołączonym w pracy wykazie zadań (w rozdziale „Cel i hipoteza badawcza”) dodatkowe cele cząstkowe powinny się tu również znaleźć aby można było skonfrontować je z uzyskanymi w pracy wynikami, a przede wszystkim z zamieszczonymi w niej wspomnianymi wnioskami (9-11). W przeciwnym razie wnioski te raczej nie powinny być uwzględnione w dysertacji chyba że jest to też wynik realizacji zad. 2 - dotyczącego określenia odsetka izolatów *S. uberis* w ramach tzw. szerzej rozumianej „sytuacji zoohigienicznej w hodowli”, obejmującej również wspomniane wyżej okoliczności, tj. dipping, DC i szczepienia.

Kolejny rozdział zawiera opis materiałów i metod użytych w badaniach. Materiał badawczy stanowiły 194 próbki mleka oraz krwi pobrane od krów rasy hf w 28 gospodarstwach zlokalizowanych w kraju na terenie woj. kujawsko-pomorskiego o łącznej obsadzie 1241 krów, ich średniej wydajności osobniczej 8700 kg mleka

rocznie i LKS w granicach od 80 do 750 tys/ml mleka. Dominującym sposobem utrzymania krów był system uwiązowy z żywieniem TMR, z prowadzeniem u krów terapii DC (93 % stad), dezynfekcji poudojowej (50 % stad) lub łącznej (23 % stad), szczepień ochronnych (57% stad) oraz stopniem czystości krów kształtującym się odpowiednio: III (36 % stad), II (25 % stad), I (21 % stad) i IV (18 % stad). W przypadku zaś badanych parametrów laboratoryjnych uwzględniono: rutynową ocenę makroskopową mleka wraz z TOK, badanie hodowlane mleka, próbę enzymatyczną bakterii na katalazę, wstępną identyfikację drobnoustrojów na podłożu Chodkiewicza-Edwardsa i chromogennym (CHROMagar Mastitis), a w końcowym etapie badań dokonano identyfikacji gatunkowej wyizolowanych drobnoustrojów. W celu oceny odpowiedzi immunologicznej w organizmie krów chorych na zapalenie wymienia na tle *S. uberis* badano w surowicy i mleku tych zwierząt: stężenie amyloidu A (SAA i MAA) oraz wybranych interleukin (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 β) i czynnika martwicy nowotworu (TNF- α). Określano też fenotypową i genotypową lekowrażliwość szczepów *S. uberis* poprzez ustalenie ich profilu fenotypowego dla antybiotyków powszechnie stosowanych w terapii *mastitis* (już wcześniej wymienionych) oraz za pośrednictwem badań molekularnych z izolacją genomowego DNA bakterii, oceniając - obecność odpowiednich genów odpowiedzialnych za oporność badanego paciorkowca.

Bazując na tak zróżnicowanym materiale i wszechstronnym warsztacie badawczym Doktorantowi, w toku konsekwentnie realizowanego zasadniczego celu pracy doktorskiej, udało się ustalić, że *S. uberis* jest istotnym czynnikiem zakaźnym zapaleń wymienia u krów mlecznych bowiem jego izolaty stanowiły 17 % wszystkich wyizolowanych szczepów bakterii z mleka krów chorych. Okazało się też, że *S. uberis* ma również duży potencjał zakaźny mimo jego środowiskowego charakteru i dużą zdolność aktywacji układu immunologicznego gospodarza wykazaną znaczącym wzrostem badanych parametrów zapalnych i odpornościowych. Doktorant w badaniach własnych stwierdził 9-krotny wzrost stężenia MAA, 3,5-krotny IL-1 β , 3,7-krotny IL-6, 2-krotny IL-8, 3,8-krotny IL-12 β oraz 4,2-krotny TNF- α w mleku krów chorych na zapalenie wymienia wywołane przez *S. uberis* w porównaniu do mleka krów zdrowych.

Ocena lekowrażliwości szczepów *S. uberis* pozwoliła wyodrębnić 21 różnych profili. Najczęściej powtarzającym się wzorem była jednoczesna oporność na tetracyklinę, erytromycynę i linkomycynę. Wielolekooporność została stwierdzona u

33,3% szczepów *S. uberis*. 20,0% szczepów *S. uberis* było wrażliwych lub średniowrażliwych na wszystkie antybiotyki. Największą aktywność *in vitro* wykazały cefoperazon, cefquinom, cefaleksyna, penicylina oraz ceftiofur (odpowiednio: 100%, 100%, 93,3%, 90,0%, 86,7% wrażliwych/średniowrażliwych szczepów *S. uberis*). Badania molekularne potwierdziły obecność 36 genów determinujących oporność na różne grupy antybiotyków. Występowanie co najmniej jednego genu oporności stwierdzono u 66,7% szczepów *S. uberis*. Największy odsetek stanowiły geny *tet* odpowiedzialne za oporność na tetracykliny: 12 genów *tetL*, 10 genów *tetM* oraz 3 geny *tetO*. W dalszej kolejności stwierdzono obecność genów kodujących oporność na: makrolidy – 4 geny *ermB*, linkozamidy – 4 geny *linB*, antybiotyki β -laktamowe – 2 geny *blaZ* oraz aminoglikozydy – 1 gen *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*.

W kontekście uzyskanych wyników w zakresie lekowrażliwości *S. uberis* ważnym spostrzeżeniem Doktoranta było wykazanie ciekawej zależności, częściowego braku (u ponad 30 % szczepów) pełnej zgodności wyodrębnionych *in vitro* profili oporności fenotypowej patogenu w konfrontacji z badaniem molekularnym w oparciu o odpowiednią genetyczną determinantę ocenianej lekooporności. Konstatując, trzeba więc pamiętać, że profil oporności fenotypowej *S. uberis* nie zawsze zgodny jest z jej profilem oporności genotypowej. Warto pamiętać również, że w przypadku wykazanej w tych badaniach wielolekooporności szczepów *S. uberis* (u ponad 30% na co najmniej 3 antybiotyki) izolowanych od krów z zapaleniem wymienia wywoływanych przez tego paciorkowca odpajanie cieląt mlekiem pochodzącym od takich krów, jako potencjalnego rezerwuaru groźnego patogenu, powinno być istotnie ograniczone lub przynajmniej poprzedzone jego termiczną obróbką (pasteryzacja).

Kluczowym efektem badań Doktoranta o trudnym do przecenienia aplikacyjnym znaczeniu było wykazanie korzystnej roli stanu higienicznego krów i środowiska oraz technik przeciwdziałania zakażeniom wymienia w postaci stosowania terapii DC i szczepień na ograniczenie występowania patogennych szczepów *S. uberis* w otoczeniu krowy w stadzie. W stadach krów o wysokim stopniu czystości (I i II) częstotliwość izolacji szczepów *S. uberis* z mleka krów chorych na *mastitis* była zdecydowanie niższa w porównaniu do stad z III i IV stopniem czystości. Ponadto zastosowanie antybiotykowego preparatu dowymieniowego o przedłużonym działaniu w okresie zasuszenia krowy (SDCT – *Selective Dry Cow Therapy*) zmniejszyła odsetek zakażeń wymienia wywołanych przez *S. uberis*. Ze stad, w

których wprowadzono terapię *dry cow* wyizolowano blisko 6-krotnie mniej szczepów *S. uberis* w przeliczeniu na jedną krowę w porównaniu do stad nie stosujących tej formy terapii *mastitis*. Doktorant zaobserwował również w swoich badaniach, że stosowanie szczepionek skierowanych przeciwko *S. uberis* zmniejsza istotnie występowanie przypadków *mastitis* w stadach szczepionych krow, a odsetek izolatów tego patogenu w tych stadach w przeliczeniu na 1 krowę był też zdecydowanie niższy niż u nieszczepionych (1/49,4 vs 1/33,3). Doktorant wskazał również na preferencyjny charakter ochronny o wiele bardziej wyrażonej w przypadku stosowania szczepionki celowanej przeciw *S. uberis*.

Dużym zaskoczeniem w przypadku porównania efektów różnych działań prewencyjnych było natomiast stwierdzenie, że stosowanie technik dezynfekcji wymienia przed- i poudojowych ma zgoła inny wpływ niż omówione wcześniej praktyki. Nieoczekiwanym rezultatem było bowiem wykazanie, że odsetek krow, od których wyizolowano szczepy *S. uberis* był zdecydowanie wyższy w stadach, w których stosowano preparaty postdippingowe lub łącznie pre- i postdippingowe w porównaniu do całkowitego braku przed i poudojowej dezynfekcji strzyków wymion. Zgodnie z przyjętymi w praktyce opiniami, jak też opinią samego Autora badań to nieoczekiwane zjawisko prawdopodobnie może być spowodowane możliwością przenoszenia patogenów środowiskowych stale obecnych na skórze strzyków i w kanale strzykowym, szczególnie w przypadku zanurzania strzyków wymion kolejnych krow w tym samym naczyniu zawierającym środek dezynfekcyjny.

Dlatego też, wyłączone stosowania pre- i postdippingu w oczekiwaniu pozytywnych efektów ochronnych w przypadku patogenów środowiskowych takich jak *S. uberis* może nie być zadowalające. W tym celu należy pamiętać o kompleksowym podejściu i uzupełnianiu mniej skutecznych procedur innymi działaniami, tj. SDCT i szczepieniami nie zapominając przy tym o odpowiedniej higienie i stanie czystości zwierząt i środowiska jako najbardziej efektywnym postępowaniu wykazany również w badaniach Doktoranta. Działania te mają również na celu dążenie do ograniczania zużycia antybiotyków w rutynowej terapii *mastitis* wpisując się w globalną politykę przeciwdziałania niekontrolowanemu narastaniu lekooporności środków przeciwbakteryjnych w terapii ludzi i zwierząt.

Podsumowując przedstawiona do recenzji praca doktorska jest jednym z pierwszych tak kompleksowych opracowań obejmującym badaniem nie tylko sam

patogen *S. uberis* pod kątem jego cech charakterystycznych i roli w epidemiologii zapaleń wymienia w stadach krów mlecznych z oceną jego lekowrażliwości i wpływu na humoralną odpowiedź immunologiczną ale również, znaczenia struktury stada jego odmiennych procedur i stosowanych praktyk w szeroko pojętej profilaktyce *mastitis* wywoływanych przez ten ważny, środowiskowy czynnik chorobotwórczy.

Wykonane badania istotnie przybliżają nas do poznania złożoności problemu udziału *S. uberis* w etiopatogenezie zapaleń gruczołu mlekowego w rodzimych stadach krów mlecznych pod kątem jego wpływu na humoralne mechanizmy odpowiedzi zapalnej w zakażonym paciorkowcem wymieniowym - *S. uberis* organizmie gospodarza poprzez monitoring kształtowania się wybranych najbardziej reprezentatywnych markerów zapalenia w postaci odpowiednich prozapalnych cytokin (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 β , TNF- α) oraz indykatorowego dla bydła białka ostrej fazy (SAA, MAA). Wyniki badań własnych Doktoranta wykazały, że u krów z *mastitis* na tle zakażeń *S. uberis* w początkowej fazie infekcji dochodzi najpierw do rozwoju miejscowego odczynu zapalnego i odpowiedzi ostrej fazy (OOF), której wyrazem jest wzrost stężenia określonych białek ostrej fazy (bof). Wg danych literaturowych przyjmuje się, że najważniejszym z punktu widzenia zapalenia wymienia u krów wskaźnikowym bof jest stężenie izoformy 3 surowiczego amyloidu A. Jego rola wskaźnikowa jest jednak widoczna wyłącznie w ocenie jego stężenia w mleku krów chorych. Fakt ten wykazał Doktorant w swoich badaniach stwierdzając aż 9-krotny wzrost MAA w mleku krów chorych w porównaniu z mlekiem krów zdrowych. Ta wyjątkowa specyfika zmian tego białka w mleku zwierząt z *mastitis* w porównaniu do jego bardziej stabilnej komponenty surowiczej (SAA) może być wykorzystane jako przydatny w praktyce wczesny marker wykrywania zapalenia wymienia zważywszy na łatwość jego badania i dostępność materiału. Doktorant w swoich badaniach potwierdził również wiodącą rolę *S. uberis* w etiologii *mastitis* u krów mlecznych (17 % izolowanych szczepów tego zarazka) ugruntowując jego pozycję czołowego czynnika środowiskowego w powstawaniu choroby. Doktorant zwrócił też uwagę na konieczność przeprogramowania działań profilaktycznych, które powinny być skoncentrowane bardziej na poprawę stanu higienicznego krów, czystości ich ciała i środowiska. W profilaktyce zakażeń *S. uberis* nie mniej ważne wg Doktoranta jest również utrzymanie dotychczasowych praktyk stosowania SDCT oraz programów immunoprofilaktycznych zwłaszcza z udziałem nowoczesnych szczepionek celowanych skierowanych przeciwko odpowiednim serotypom tego patogenu.

Ważnym wkładem Doktoranta w postęp nauki i praktyki wet. było wykazanie w badaniach własnych występowania wielolekooporności u wielu izolowanych szczepów *S. uberis* co ma duże implikacje praktyczne w przypadku podjęcia terapii antybiotykowej, a możliwe to było dzięki wykorzystaniu nowoczesnych metod oceny profili feno- i genotypowych badanej bakterii.

W przyjętym bardziej kompleksowym podejściu do realizacji zadania badawczego stanowiącego przedmiot rozprawy doktorskiej Doktorant podjął duże ryzyko jego realizacji w tak wielowątkowym (wielopłaszczyznowym) ujęciu jednak zrealizował je konsekwentnie do końca i uzyskał interesujące dane. O właściwym ukierunkowaniu badań świadczą m.in. uzyskane wyniki, które pozwoliły Autorowi na sformułowanie aż 11 wniosków podsumowujących w zasadzie wszystko co udało się w pracy wykazać. Część tych wniosków (9-11), co już wcześniej skomentowano, nie miało zakotwiczenia w przyjętych szczegółowych celach pracy. Wydaje się więc zasadnym, oczekiwać wyjaśnienia tego faktu ze strony Doktoranta podczas dyskusji w przebiegu publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

Ponadto, obowiązkiem Recenzenta jest również, w miarę swoich możliwości i posiadanej wiedzy zwrócić uwagę na pewne niedociągnięcia/niejasności, których nie ustrzegł się Autor w trakcie przygotowywania dysertacji doktorskiej. W większości są one jednak natury stylistyczno-edytorskiej (przykładowo: w pracy przyjęto równocześnie angielską i polską formę określania skrótów rycin, tj: Fig. i Ryc. Pamiętając jednak, że formalnie pracę doktorską przygotowujemy w języku polskim, oczywiście poza krótkim streszczeniem anglojęzycznym, skróty techniczne takie jak Ryc. dla przedstawienia rycin powinny mieć wyłącznie polską wersję. Wyjątek stanowią oczywiście terminy użyte w tekście, a przedstawione w odpowiednim „wykazie skrótów”), a tylko niektóre, te o bardziej merytorycznym charakterze wymagały wyeksponowania, aby ich późniejsza korekta w trakcie ostatecznego przygotowywania pracy do druku mogła coś wnieść i przyczynić się do poprawy oraz większej przejrzystości jej końcowej edytorskiej wersji.

Poniżej, niektóre z nich (w większości w formie pytań):

1. W jaki sposób **kwalifikowano zwierzęta** do badań i jak oceniano ich stan kliniczny? W przypadku stwierdzenia klinicznej formy zapalenia wymienia, jak się przedstawiała jego **syptomatologia**?. Brakuje w pracy opisu statusu zdrowotnego

zwierząt użytych w badaniach wraz z ich profilem osobniczym (wiek, liczba laktacji, wskaźniki rozrodu, przebyte choroby i ich leczenie itp.).

2. Jaki przyjęto **model/klucz do oceny stanu/stopnia czystości krów** wykorzystanych w badaniach oznaczonych jako I, II, III i IV ?

3. W jaki sposób sprawowano **bieżącą kontrolę** nad stanem zdrowotnym zwierząt i prowadzonym postępowaniem immunoprofilaktycznym z udziałem szczepień ochronnych (dobór szczepionek, ich rodzaj, czas i częstotliwość podawania, obserwacje kliniczne, efekty itp.) ?

4. Dołączone do pracy piśmiennictwo wymaga wnikliwej rewizji. Niektóre z cytowanych w tekście pozycji nie widnieją bowiem w wykazie np. *Shuster i wsp.*, 2017, inne nie posiadają analogicznych dat wydania z przedstawionymi w wykazie, np. str. 24 pozycja: *Tóthová i wsp.*, w tekście 2004 w spisie 2014, kolejna na str. 26: *Mestrovic i wsp.* w tekście 2019 w spisie 2012, dalej, wielokrotnie cytowana na str. 28, 29-3x, 30, 31, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74: *Zouharowa i wsp.* w tekście rok 2023 w wykazie 2022 i wreszcie na str. 67: *Lahouassa et al.* w tekście 2007 w spisie piśmiennictwa 2008. Ponadto w tym przypadku oraz też w innych miejscach na tej samej stronie, tj. w pozycjach: *Bannerman et al. 2004a* i *Watanabe et al. 2008* użyto błędnie, biorąc pod uwagę wymogi polskiego opracowanie, zamiast polskojęzycznego skrótu „i **wsp**”, angielską, obcą formę – et al.

Wymienione wyżej niedociągnięcia w edycji pracy, przed jej ostatecznym przekazaniem do druku, wymagają stosownych korekt.

Wspomniane uwagi i zapytania nie mają jednak istotnego wpływu na ogólną bardzo dobrą ocenę przygotowanej rozprawy doktorskiej.

Podsumowując, pragnę podkreślić, że recenzowana rozprawa doktorska wnosi nowe, istotne dane do nauki i w sposób znaczący pogłębia wiedzę z zakresu charakterystyki i epidemiologii *Streptococcus uberis* w zapaleniach wymienia u krów, a jej rozbudowana forma obejmująca też aspekty immunologiczne i zoohigieniczne jest z gruntu nowym podejściem w omawianym obszarze badaniach klinicznych.

Pan lek. wet. Przemysław Błaszczuk dobrze wywiązał się z postawionego sobie zadania. Schemat badań zaplanował ambitnie i dokładnie je wykonał, przy użyciu powszechnie akceptowanych, aktualnych metod badawczych, gwarantujących wiarygodność uzyskiwanych wyników. W pracy zamieszczono rzetelnie wykonaną

dokumentację graficzną z przeprowadzonych badań, która ułatwia czytającemu weryfikację wyników badań.

Stwierdzam zatem, że rozprawa doktorska Pana **lek. wet. Przemysław Błaszczyka** pt. „Charakterystyka i epidemiologia szczepów *Streptococcus uberis* wyizolowanych z mleka krów chorych na zapalenie wymienia” odpowiada warunkom określonym w art. 187 Ustawy: *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* z dn. 20 lipca 2018 r. (Dz.U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.) i może być podstawą do nadania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauki weterynaryjnej w dyscyplinie weterynaria. Biorąc pod uwagę powyższe, zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Naukowej Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o dopuszczenie Pana **lek. wet. Przemysław Błaszczyka** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Puławy, 06.02.2026 r.


prof. dr hab. Dariusz Bednarek