

Ocena pracy doktorskiej lek. wet. Przemysława Błaszczyka
pt: „Charakterystyka i epidemiologia szczepów *Streptococcus uberis*
wyzolowanych z mleka krów chorych na zapalenie wymienia”

Prof. dr hab. Wojciech Barański
Katedra Rozrodu Zwierząt z Kliniką
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Ul. Oczapowskiego 14
10-719 Olsztyn

Olsztyn, dn. 11.02.2026

Ocena rozprawy doktorskiej lek. wet. Przemysława Błaszczyka
pod tytułem „**Charakterystyka i epidemiologia szczepów *Streptococcus uberis***
wyzolowanych z mleka krów chorych na zapalenie wymienia” wykonana w
związku z uchwałą Rady Dyscypliny Naukowej Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w
Lublinie z dnia 4 grudnia 2025 roku

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska lekarza weterynarii Przemysława Błaszczyka została wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Katedry Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, której promotorem jest dr hab. Mariola Bochniarz prof. uczelni.

W obecnych czasach hodowla bydła mlecznego jest bardzo mocno powiązana z opłacalnością tej gałęzi produkcji rolnej oraz bezpieczeństwem żywności pochodzenia zwierzęcego. Choroby wymienia stanowią dla hodowców jedną z najbardziej kosztownych grup schorzeń i duża częstotliwość stosowania różnych leków w przypadku *mastitis* powoduje zagrożenie obecności ich pozostałości w mleku. Powoduje to przede wszystkim zagrożenie dla zdrowia i życia ludzi, przyczyniając się do narastania antybiotykooporności różnych drobnoustrojów stanowiących potencjalne zagrożenie dla ludzi, jak i zwierząt. Badania dotyczące bakterii będących często przyczyną zapaleń wymienia, w powiązaniu z warunkami higienicznymi w oborach i przyjętymi strategiami ograniczenia tych chorób pozwalają na szersze i głębsze poznanie tego problemu w warunkach krajowych, jak również znalezienie praktycznych wskazań umożliwiających ograniczenie występowania schorzeń gruczołu mlekowego u bydła mlecznego. Podejmując się realizacji badań w tym zakresie Autor dokonał oceny aktualnego stanu wiedzy w zakresie etiologii i patogenezы zapaleń wymienia u krów z szczególnym uwzględnieniem charakterystyki *Streptococcus uberis* dotyczącym czynników wirulencji powyższej bakterii, reakcji organizmu i układu immunologicznego na zakażenie oraz wrażliwości na stosowane w terapii antybiotyki. Dokonana analiza literatury obejmująca

Ocena pracy doktorskiej lek. wet. Przemysława Błaszczyka
pt: „Charakterystyka i epidemiologia szczepów *Streptococcus uberis*
wyzolowanych z mleka krów chorych na zapalenie wymienia”

powyższe zagadnienia pozwoliła na sformułowanie tematu pracy, ustalenie jej hipotez badawczych, dobór metod i realizację eksperymentów jak również dyskusję uzyskanych wyników w odniesieniu do badań wcześniejszych i obecnej wiedzy.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska obejmuje 100 strony maszynopisu, posiada klasyczny układ dla tego typu opracowań z następującymi rozdziałami: spis treści, wykaz skrótów, streszczenie, summary, wstęp, cel i hipoteza badawcza, materiał i metody, analiza statystyczna, wyniki badań, dyskusja, wnioski, piśmiennictwo. Na uznanie zasługuje bardzo liczna (201 pozycji) i aktualna literatura, na którą Doktorant powołuje się i z którą konfrontuje własne wyniki. W tekście dysertacji zawarte są 2 ryciny, 5 wykresów oraz 16 tabel. Wyniki badań poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem testu Shapiro-Wilka do oceny rozkładu normalności danych, testu Manna-Whitneya dla dwóch prób niezależnych przy użyciu programu Statistica 12.0.

We wstępie Doktorant podaje formy w jakiej może przebiegać choroba z opisem objawów i wartościami granicznymi liczby komórek somatycznych dla zwierząt zdrowych i chorych. Przedstawiona jest systematyka bakterii z rodzaju *Streptococcus spp.* umiejscawiając w niej *Streptococcus uberis* i przedstawiając tego paciorkowca jako czynnik etiologiczny zapaleń wymienia. Bardzo szczegółowo przedstawiona jest reakcja układu immunologicznego na zakażenie w odniesieniu do czynników wirulencji charakterystycznych dla opisywanego drobnoustroju. W końcowej części wstępu przedstawione są dane dotyczące wrażliwości paciorkowców na antybiotyki stosowane w terapii mastitis wraz z mechanizmami oporności wykorzystywanymi przez te bakterie.

Badania przedstawione w rozprawie miały na celu:

- ocenę epizootyczną występowania *Streptococcus uberis* w stadach krów mlecznych znajdujących się w województwie kujawsko-pomorskim;
- określenie zależności odsetka wyizolowanych szczepów *Streptococcus uberis*, a sytuacją zoohigieniczną w hodowli;
- ocenę natężenia odpowiedzi immunologicznej u krów chorych na zapalenie wymienia wywołane przez *Streptococcus uberis* w oparciu o określenie poziomu białka ostrej fazy: surowiczego amyloidu A oraz cytokin prozapalnych: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 β i TNF- α w mleku oraz surowicy krów;
- ustalenie fenotypowych profili lekowrażliwości *Streptococcus uberis* na antybiotyki najczęściej stosowane w leczeniu mastitis u krów: penicylinę, cefaleksynę, cefoperazon, cefquinom, ceftiofur, tetracyklinę, erytromycynę oraz linkomycynę;

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

- analizę molekularnych determinantów lekooporności szczepów *Streptococcus uberis* wywołujących zapalenie wymienia u krów.

Badania przeprowadzono w 28 stadach krów mlecznych zróżnicowanych pod względem liczby zwierząt (od 22 do 88 krów), systemu utrzymania (uwiązowy i wolnostanowiskowy) i doju (trzy różne rodzaje). Gospodarstwa dodatkowo analizowano pod kątem stosowania selektywnej terapii antybiotykowej krów zasuszonych, prowadzonych szczepień profilaktycznych w kierunku ograniczenia zapaleń gruczołu mlekowego, stosowania różnych metod higieny doju oraz czystości strzyków. Od 194 krów podejrzanych na podstawie badania wymienia o *mastitis*, pobrano próby mleka i krwi oraz takie same próby pozyskano od 10 zdrowych krów, tworzących grupę kontrolną. Mleko zostało zbadane laboratoryjnie i identyfikację drobnoustrojów wykonano na podstawie morfologii kolonii oraz testu katalazy, następnie wykonano posiew na podłoże chromogenne i obecność *Streptococcus uberis* potwierdzono dwoma metodami molekularnymi: spektrometrii mas i reakcją PCR. Spośród pobranych prób u 176 wyizolowano drobnoustroje i 30 z nich rozpoznano jako szczepy paciorkowca wymienia. Pobrane próby krwi odwirowano i w surowicy oraz w mleku oznaczono następujące parametry odpowiedzi immunologicznej: stężenia amyloidu A, poziomu IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 oraz TNF- α . Wyizolowane szczepy *Streptococcus uberis* zostały poddane ocenie lekowrażliwości z wykorzystaniem metody dyfuzyjno-krażkowej oraz badano obecność genów odpowiedzialnych za oporność bakterii na antybiotyki.

Wyniki przedstawiono na stronach 48-61 z wykorzystaniem 13 tabel. Wykazano, że w stadach stosujących selektywną terapię znacznie rzadziej izolowano *Strep. uberis*, podobną zależność zauważono w gospodarstwach w których wdrożono programy szczepień, przy czym największą skuteczność (liczba zwierząt, na które przypadała jedna pozytywna próbka) wykazano w gospodarstwach stosujących komercyjną szczepionkę Ubac. Oceniając skuteczność prowadzonej higieny doju lek. wet. Przemysław Błaszczyk stwierdził, ich słabą skuteczność, gdyż w stadach w których wprowadzono dwa sposoby stwierdzano jednocześnie największą liczbę pozytywnych przypadków, ale analiza czystości krów wykazała odwrotną zależność. Analizując reakcje białek ostrej fazy stwierdzono istotnie wyższe stężenie amyloidu A w mleku krów chorych (2817,5 ng/ml vs 318,25 ng/ml), bez widocznych różnic w surowicy. Podobne zależności (wyższe stężenia w mleku chorych niż zdrowych zwierząt oraz wyższe w surowicy zdrowych niż chorych) wykazano w przypadku wszystkich badanych cytokin prozapalnych (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 oraz TNF- α), przy czym tylko w przypadku IL-8 różnice te nie były statystycznie istotne. Ocena antybiotykkooporności szczepów *Strep. uberis* wykazała

Ocena pracy doktorskiej lek. wet. Przemysława Błaszczyka
pt: „Charakterystyka i epidemiologia szczepów *Streptococcus uberis*
wyzolowanych z mleka krów chorych na zapalenie wymienia”

21 różnych profili nieskutecznych leków, a najczęściej występującą była jednoczesna niewrażliwość na tetracyklinę, erytromycynę i linkomycynę. Bardzo ważną informacją, z perspektywy zalecanych leków w terapii, jest brak szczepów opornych na niektóre cefalosporyny III i IV generacji takie jak cefoperazon i cefquinom. Badanie obecności w genomie genów oporności wykazało występowanie 8 różnych, przy czym występowały one w różnych układach, pozwalających na opisanie 11 profili. Bardzo interesującą obserwacją było znalezienie 10 szczepów *Streptococcus uberis*, u których nie wykryto ani jednego genu oporności, a jednocześnie obserwowana była ich oporność fenotypowa, stwierdzona metodą krążkowo-dyfuzyjną.

Analizując i polemizując z uzyskanymi wynikami swoich badań Doktorant wysnuwa jedenaście wniosków stwierdzając, że:

1. *Streptococcus uberis* należy do istotnych czynników etiologicznych zapalenia wymienia u krów mlecznych. Szczepy *S. uberis* stanowiły 17,0% wszystkich szczepów bakterii wyizolowanych z mleka krów chorych na zapalenie wymienia.

2. Ocena parametrów odpowiedzi immunologicznej potwierdziła zdolność *S. uberis* do aktywacji układu immunologicznego wymienia. W badaniach własnych stwierdzono znaczący wzrost poziomu wszystkich badanych, ściśle ze sobą powiązanych czynnościowo cytokin (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 β , TNF- α) oraz amyloidu A w mleku krów chorych na *mastitis* w porównaniu do mleka krów zdrowych.

3. Ocena stężenia amyloidu A w mleku może zostać uznana za potencjalny marker prognostyczny zapalenia wymienia powodowanego przez *S. uberis*. Poziom MAA był statystycznie istotnie wyższy w mleku krów z *mastitis* w porównaniu do grupy kontrolnej.

4. Największą aktywność wobec szczepów *S. uberis* w badaniu *in vitro* wykazały antybiotyki β -laktamowe, zalecane jako leki pierwszego wyboru w leczeniu *mastitis* u krów: cefoperazon, cefquinom, cefaleksyna, penicylina oraz ceftiofur.

5. Wyizolowane z mleka szczepy *S. uberis* mogą stanowić źródło genów determinujących oporność na różne grupy antybiotyków. W przypadku 66,7% szczepów *S. uberis* wykryto co najmniej 1 gen oporności.

6. Profile oporności fenotypowej szczepów *S. uberis* nie są zgodne z profilami oporności genotypowej tych patogenów. W przypadku 33,3% szczepów *S. uberis* wykazujących fenotypową oporność na wybrane antybiotyki w badaniu *in vitro* badania molekularne nie potwierdziły genetycznej determinanty tej lekooporności.

7. Mleko krów chorych na zapalenie wymienia może być potencjalnym rezerwuarem wielolekoopornych szczepów *S. uberis*. 33,3% badanych szczepów *S. uberis* wykazało oporność na co najmniej 3 antybiotyki.

8. Jednym z najbardziej efektywnych sposobów eliminacji szczepów *S. uberis* jest utrzymanie czystości krów oraz całego środowiska, w którym te zwierzęta przebywają. W stadach o wysokim stopniu czystości krów (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.

9. Efekt stosowania przed i poudojowej dezynfekcji strzyków wymion krów w przypadku patogenów środowiskowych, takich jak *S. uberis* może nie być zadawalający. Odsetek krów, od których wyizolowano szczepy *S. uberis* był większy w stadach, w których stosowano preparaty postdippingowe lub łącznie pre- i postdippingowe w porównaniu do całkowitego braku przed i poudojowej dezynfekcji strzyków wymion.

10. Zastosowanie antybiotykowego preparatu dowymieniowego o przedłużonym działaniu w okresie zasuszenia krowy zmniejsza odsetek zakażeń wymion wywołanych przez *S. uberis*. Ze stad, w których stosowano antybiotyki *dry cow* wyizolowano 6-krotnie mniej szczepów *S. uberis* w porównaniu do stad niewdrażających terapii DC.

11. Szczepienie krów można uznać za jedno z najbardziej obiecujących działań profilaktycznych zapobiegających *mastitis* wywołanemu przez *S. uberis*. Badania własne potwierdziły wysoką skuteczność stosowania szczepionek skierowanych przeciw *S. uberis*. Odsetek szczepów *S. uberis* wyizolowanych z mleka krów chorych na *mastitis* w stadach szczepionych był zdecydowanie niższy w porównaniu do stad nieszczepionych.

Przedstawiona od oceny rozprawa doktorska jest napisana w sposób uporządkowany i bardzo starannie od strony graficznej. Opracowanie profili antybiotykooporności wraz z analizą występowania genów oporności ma duże znaczenie poznawcze i aplikacyjne dla lekarzy weterynarii zajmujących się kontrolą *mastitis* w swojej praktyce. Bardzo istotne z tej perspektywy jest także udokumentowanie spadku częstotliwości występowania zakażeń *Streptococcus uberis* w stadach w których wprowadzono szczepienie szczególnie preparatem skierowanym przeciwko temu drobnoustrojowi. Bardzo ważnym aspektem dysertacji jest ocena lekooporności, ponieważ jest to problem coraz bardziej narastający, a wszystkie badania z nim związane należy uznać za bardzo wartościowe, tym bardziej jeżeli dzięki temu posiadamy własne, krajowe badania. W dyskusji Autor zarówno konfrontuje wyniki własne z uzyskanymi przez innych badaczy, jak i stara się je wbudować do istniejącego stanu wiedzy, co potwierdza

Ocena pracy doktorskiej lek. wet. Przemysława Błaszczyka
pt: „Charakterystyka i epidemiologia szczepów *Streptococcus uberis*
wyzolowanych z mleka krów chorych na zapalenie wymienia”

nowatorski charakter przeprowadzonych badań. Sformułowane wnioski są prawidłowe i odzwierciedlają wyniki uzyskane w toku przeprowadzonych badań. Z obowiązku recenzenta muszę wspomnieć o mankamentach ocenianej rozprawy doktorskiej:

- we wstępie w podrozdziale 1.1 Doktorant opisuje różne formy zapaleń gruczołu mlekowego, brak jednak opisu cech charakterystycznych dla formy przewlekłej o której pisze na str. 16 i 66;

- rozdział Materiał i Metody – w manuskrypcie brak informacji o zgodzie Lokalnej Komisji Etycznej na pobranie krwi od krów chorych i będących grupą kontrolną, co powinno zostać uzupełnione;

- na stronie 33 Doktorant opisuje sposób doju jako 3 kanwy, zaś w Tabeli 1 jako kany – nazewnictwo powinno być ujednolicone;

- ponieważ stada od których pobierano próby są bardzo zróżnicowane (różna liczebność, systemy doju i utrzymania) podanie średniej wydajności dla wszystkich stad (8700kg rocznie) nie pozwala na dodatkowe analizy zależności pomiędzy badanymi parametrami a wydajnością mleczną i nie przedstawia w pełni stad w których prowadzone były badania;

- skąd pochodzą dane dotyczące liczby komórek somatycznych w stadach podane na stronie 33 oraz w Tabeli 1a i 1b? Jakiego okresu dotyczą?

- na stronach 36-38 przedstawiono wykresy charakteryzujące stada w których prowadzone były badania, ale pomimo analizy występowania *Streptococcus uberis* w zależności od opisanych parametrów brak odnośników do nich w tekście;

- czy przeprowadzona była analiza antybiotyków stosowanych w ramach selektywnego zasuszania pod kontrolą antybiotyków? Czy badane szczepy paciorkowca wymienia były wrażliwe na stosowane leki w wykonanych testach dyfuzyjno-krażkowych? Jeżeli nie to czy na pewno ta metoda była odpowiedzialna za mniejszą liczbę zakażeń badaną bakterią?

- na stronie 37 (Fig. 4) i 52 (Tab. 7) – opisane są poziomy czystości krów I-IV, ale brak opisu kryteriów stosownych do zakwalifikowania krów do odpowiedniego poziomu. Brak również informacji w materiałach i metodach kto i kiedy oceniał czystość krów;

- w podrozdziale dotyczącym pobierania prób do badań laboratoryjnych na stronie 38 brak dokładnego sposobu pobierania prób do badań bakteriologicznych – ich nieprawidłowe wykonanie wpływa na wynik badania mikrobiologicznego; w tym samym podrozdziale brak dokładnego opisu jaki wynik testu TOK (wątpliwy, słabo, wyraźnie czy silnie dodatni) został zakwalifikowany przez lek. wet Przemysława Błaszczaka jako dodatni uprawniający do pobrania prób;

Ocena pracy doktorskiej lek. wet. Przemysława Błaszczyka
pt: „Charakterystyka i epidemiologia szczepów *Streptococcus uberis*
wyzolowanych z mleka krów chorych na zapalenie wymienia”

- na stronie 39 opisane jest badanie kliniczne zwierząt, od których pobrano próby i jedynym kryterium był dodatni wynik TOK, natomiast bardzo istotną informacją szczególnie w odniesieniu do analizy parametrów immunologicznych jest forma zapalenia, która nie jest opisana. W efekcie nie wiadomo czy były to zwierzęta z formą podkliniczną, kliniczną czy przewlekłą, które mogą dawać inną odpowiedź układu immunologicznego;

- w opisie identyfikacji drobnoustrojów w próbach brak informacji przy ilu jednostkach tworzących kolonie uznawano próbę za dodatnią;

- rozdział Wyniki badań: przydatna dla czytającego byłaby tabela z opisem innych wyizolowanych drobnoustrojów, liczbą prób negatywnych oraz liczbą szczepów wyizolowanych z każdej próby jako dodatkowe informacje charakteryzujące stada i próby;

- czytając wyniki i dyskusję problem sprawiał mi opis liczby izolowanych szczepów i stwierdzonych genów. Na stronie 48 Doktorant pisze:” Ze 194 próbek mleka wyizolowano 176 szczepów drobnoustrojów, w tym 30 szczepów należących do gatunku *S. uberis* (17,0%).” Co może sugerować, że potwierdzono obecność 176 różnych drobnoustrojów w tym 30 różnych szczepów *S. uberis*. Czy opis „przypadki”, zamiast „szczepów” nie byłby bardziej jednoznaczny? Podobnie na stronie 60 Doktorant pisze:” łącznie stwierdzono obecność 36 genów”, zaś w Tabeli 16 jest opisanych tylko 8 genów tworzących 11 profili.

- pojawiają się także nieścisłości w cytowanym piśmiennictwie – brak cytowań w manuskrypcie poz. 76, 101, 116; w spisie piśmiennictwa publikacje tego samego autora czasami są opisywane w kolejności roku publikacji, a czasami w różnej kolejności (poz. 20-23, 50-51, 66-68, 102-103, 147-148,195-197);

- w manuskrypcie pojawia się angielski opis cytowanych prac (np. Ward et al. 2009, Watanabe et al. 2008, Monistero et al. 2021), brak dopisku o współautorach (np. Tomanić 2023 zamiast Tomanić i wsp.) lub podania dopisku przy dwóch autorach (np. Sherwin i Breen 2022).

Powyższe uwagi nie obniżają wartości merytorycznej przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej, zaś całość badań uważam za bardzo potrzebne uzupełnienie danych dotyczących zakażeń wymienia przez *S. uberis* w stadach bydła mlecznego w Polsce.

W związku z powyższym uważam, że rozprawa doktorska pt. „Charakterystyka i epidemiologia szczepów *Streptococcus uberis* wyizolowanych z mleka krów chorych na zapalenie wymienia” autorstwa lek. wet. Przemysława Błaszczyka odpowiada warunkom określonym w art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20.072018 r. (tj. Dz. U. z 2024 r. z poz. 1571 z późn. zm.) i stanowi podstawę do nadania stopnią naukowego doktora.

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

Przedkładam zatem wniosek Radzie Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu
Przyrodniczego w Lublinie o przyjęcie pracy i dopuszczenie lek. wet. Przemysława Błaszczyka
do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk
weterynaryjnych w dyscyplinie weterynaria.

Prof. dr hab. Wojciech Barański


Prof. dr hab. Wojciech Barański