

Dr hab. Mariola Bochniarz, prof. uczelni  
Zakład Mikrobiologii  
Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin, 19 listopada 2024 roku

## **Recenzja pracy doktorskiej lek. wet. Aleksandry Kaczmarkowskiej**

**p.t. „Węzły chłonne świń źródłem bakterii zagrażających zdrowiu publicznemu  
– przesłanki do rozszerzonych badań poubojowych”**

**„Pig lymph nodes as a source of bacteria endangering public health –  
presumptions for expanded post-slaughter examinations”**

wykonanej w Katedrze Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego  
Instytutu Medycyny Weterynaryjnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w  
Warszawie

pod kierunkiem **prof. dr hab. Krzysztofa Anusza – promotora**  
oraz **dr Anny Didkowskiej – promotora pomocniczego.**

Recenzja została wykonana na podstawie uchwały Rady Dyscypliny Weterynaria, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie z dn. 16 października 2024 roku.

Przedstawiony do oceny materiał zawiera streszczenie oraz słowa kluczowe napisane w języku polskim oraz angielskim, spis treści, listę i objaśnienia zastosowanych w tekście skrótów, wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe oraz opis rozprawy doktorskiej zawierający podrozdziały: wstęp, cele pracy, materiał i metody, wyniki badań, dyskusję, wnioski i bibliografię. Całość dopełnia rozdział „Załączniki”, w którym znalazły się kopie pełnych wersji publikacji składających się na oceniane osiągnięcie oraz oświadczenia o indywidualnym udziale współautorów.

Oceniana praca doktorska dotyczy problemu występowania w węzłach chłonnych świń drobnoustrojów o charakterze zoonotycznym takich jak: *Streptococcus dysgalactiae*, *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus aureus* czy *Mycobacterium avium*. Drugim bardzo ważnym aspektem tego osiągnięcia naukowego jest wskazanie wieprzowiny jako potencjalnego źródła lekoopornych szczepów bakterii co stanowi obecnie jedno z najpoważniejszych zagrożeń zdrowia publicznego. W świetle danych opublikowanych przez Organizację Narodów Zjednoczonych do Spraw Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) wieprzowina jest najczęściej spożywanym mięsem na świecie zatem priorytetowym zadaniem powinno być zapewnienie jej najwyższej jakości mikrobiologicznej. Niestety Rozporządzenie wykonawcze Komisji UE 2019/627 dotyczące procedur badania poubojowego tusz świń zobowiązuje lekarzy weterynarii jedynie do oceny wizualnej węzłów chłonnych, bez konieczności ich omacywania i nacinania, co zdecydowanie zmniejsza szansę na wykrycie zmian patologicznych, a tym samym identyfikację chorobotwórczych patogenów. Ogromny niepokój budzi także obecność bakterii będących nosicielami genów lekooporności w węzłach chłonnych świń nie wykazujących żadnych zmian patologicznych, ponieważ zgodnie z obowiązującymi przepisami możliwe jest włączenie tego mięsa do łańcucha pokarmowego człowieka, a wraz z nim transfer lekoopornych szczepów drobnoustrojów. Przyczyny szybkiego rozprzestrzeniania się bakterii wielolekoopornych, należy upatrywać w nadużywaniu i nieprawidłowym stosowaniu antybiotyków zarówno w populacji ludzi jak i zwierząt. Należy podkreślić, iż znaczącą rolę w progresji tego procesu stanowi nieuzasadnione aplikowanie leków zwierzętom hodowlanym, w tym także świniom, które można uznać za ogniwo epidemiologiczne łączące środowisko, zwierzęta oraz człowieka. Zgodnie z podejściem „One Health - Jedno zdrowie” jednym z najistotniejszych elementów strategii dążącej do zminimalizowania ryzyka rozprzestrzeniania się oporności na antybiotyki jest ograniczenie ich stosowania do niezbędnego minimum chociażby dzięki ocenie lekowrażliwości patogenu odpowiedzialnego za zakażenie i zastosowaniu celowanej terapii. Ważnym filarem tego programu powinno stać się także dążenie do uzyskania większej skuteczności wykrywania zmian patologicznych w tuszach świń, a tym samym przerwania transmisji zakażeń na linii zwierzę – człowiek.



**Aktualny, niszowy charakter problemu sprawia, że temat rozprawy doktorskiej jest w pełni uzasadniony a podjęte zadania badawcze świadomie zaplanowane i celowe.**

Rozprawa doktorska ma formę cyklu trzech powiązanych tematycznie prac, w tym jednej przeglądowej oraz dwóch oryginalnych prac twórczych pod wspólnym tytułem: „Węzły chłonne świń źródłem bakterii zagrażających zdrowiu publicznemu – przesłanki do rozszerzonych badań poubojowych” („Pig lymph nodes as a source of bacteria endangering public health – presumptions for expanded post-slaughter examinations”):

1. **„The Genetic Diversity and Antimicrobial Resistance of Pyogenic Pathogens Isolated from Porcine Lymph Nodes.** Aleksandra Kaczmarkowska, Ewelina Kwiecień, Anna Didkowska, Ilona Stefańska, Magdalena Rzewuska, Krzysztof Anusz. *Antibiotics*, 2023, 126(6), 1026 (IF – 5,22; MEiN – 70 pkt)

2. **„Could the type and severity of gross lesions in pig lymph nodes play a role in the detection of *Mycobacterium avium*?”** Aleksandra Kaczmarkowska, Anna Didkowska, Sylwia Brzezińska, Daniel Klich, Ewelina Kwiecień, Izabella Dolka, Piotr Kociuba, Magdalena Rzewuska, Ewa Augustynowicz-Kopeć, Krzysztof Anusz. *PLoSone*, 2022, 17(7), e0269912. (IF – 3,7, MEiN – 100pkt)

3. **„The *Mycobacterium avium* complex – an underestimated threat to humans and animals.** Aleksandra Kaczmarkowska, Anna Didkowska, Ewelina Kwiecień, Ilona Stefańska, Magdalena Rzewuska, Krzysztof Anusz. *Annales Agriculture Environmental Medicine* 2022, 29(1), 22-27 (IF – 1,7; MEiN – 100 pkt).

Wszystkie publikacje tworzące cykl zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych w latach 2022-2023. **Łączny współczynnik wpływu (IF) tych pozycji według Journal Citation Reports wynosi 10,62 zaś punktacja MEiN 270 pkt.** We wszystkich publikacjach lek. wet. Aleksandra Kaczmarkowska jest pierwszym i korespondencyjnym autorem, a z przedłożonej dokumentacji wynika Jej wiodący udział w powstaniu tych prac, oszacowany na 55% w pierwszej, 52% w drugiej oraz 70% w trzeciej publikacji. Zakres prac prowadzonych przez Doktorantkę polegał na zbieraniu materiału do badań, współudziale w opracowaniu koncepcji i planu badań, wykonaniu doświadczeń, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowywaniu manuskryptów. Powyższe dane świadczą o wszechstronnym wkładzie i zaangażowaniu Doktorantki na każdym etapie tworzenia publikacji naukowej. Dominujący udział lek. wet. Aleksandry Kaczmarkowskiej w publikacjach potwierdzają oświadczenia przedłożone przez współautorów prac.

Publikacje wchodzące w skład cyklu zostały już opublikowane po ocenie dokonanej przez międzynarodowych ekspertów w danej dziedzinie wybranych przez stosowne wydawnictwa, co sprawia, że szczegółowa analiza i ocena wyników oraz ich interpretacja nie jest w recenzji konieczna. O wysokim poziomie tych prac świadczy renoma czasopism i wysoki współczynnik wpływu IF.

**Publikacjom tworzącym cykl towarzyszy krótkie starannie przygotowane opracowanie, które stanowi podsumowanie przeprowadzonych badań.** Autorka zadbała o czytelność i przystępność materiału, poprzez podział treści na rozdziały i podrozdziały.

**Rozdział 1. "Wstęp"** został napisany zwięźle, a dobór przedstawionych treści jest trafny i adekwatny do wyznaczonych zadań badawczych. Doktorantka w sposób bardzo spójny i czytelny wyjaśniła ważność podjętego tematu w kontekście zagrożenia zdrowia publicznego. Bardzo sprawnie powiązała w nim poznawczy wymiar swojej pracy, czyli szczegółową analizę wirulencji oraz lekooporności chorobotwórczych drobnoustrojów najczęściej występujących w węzłach chłonnych świń na podstawie dostępnej literatury, z bardzo ważnym aspektem praktycznym w medycynie weterynaryjnej jakim jest określenie minimalnego stężenia hamującego wybranych antybiotyków na wyizolowane patogeny. Wysoką wartość poznawczą posiada także przeprowadzona przez Doktorantkę analiza aktualnego stanu wiedzy na temat zakażeń wywoływanych przez *Mycobacterium avium* u ludzi i zwierząt, czynników wirulencji bakterii MAC, potencjalnych źródeł zakażenia i jego przebiegu, a także progresu w poszukiwaniu nowych skutecznych metod leczenia. Z drugiej strony dokładna interpretacja przepisów prawnych dotyczących badania poubojowego zwierząt rzeźnych i wskazanie przez Doktorantkę niedoskonałości procedur stwarzających ryzyko transmisji lekoopornych bakterii ze zwierząt na człowieka nadaje osiągnięciu naukowemu kluczowe znaczenie aplikacyjne.

Moja drobna uwaga do tej części opracowania dotyczy umieszczonej przez Doktorantkę na stronie nr. 21 informacji, że „Najczęściej wybieranymi chemioterapeutykami przeciwdrobnoustrojowymi do leczenia chorób wywoływanych przez bakterie z MAC u ludzi i zwierząt są antybiotyki makrolidowe”. Wskazana sentencja sugeruje, że antybiotyki należą do grupy chemioterapeutyków. Należy jednak podkreślić, iż nazwa „chemioterapeutyki” jest dedykowana preparatom syntetycznym nie posiadającym, w przeciwieństwie do antybiotyków, naturalnego wzorca w przyrodzie. W związku z tym proponuję użyć we wskazanym zdaniu, ale także w pozostałych częściach opracowania określenia „leki



przeciwdrobnoustrojowe”, które obejmują zarówno grupę antybiotyków jak i chemioterapeutyków.

**W rozdziale 2.** Doktorantka przedstawiła główne założenia swojej pracy:

1. Ocena występowania oraz zróżnicowania genetycznego potencjalnie zoonotycznych szczepów ropotwórczych *Streptococcus* spp., *Rhodococcus equi* i *Staphylococcus aureus* wyizolowanych z węzłów chłonnych świń ze zmianami ropnymi i bez zmian, w związku z ewentualną decyzją urzędowego lekarza weterynarii o podjęciu, poza rekomendowanym badaniem wizualnym, dodatkowej procedury badania poubojowego, rozszerzonej o badanie dotykowe i nacinanie.

2. Określenie dla potencjalnie zoonotycznych szczepów ropotwórczych *Streptococcus* spp., *Rhodococcus equi* i *Staphylococcus aureus* wyizolowanych z węzłów chłonnych świń ze zmianami ropnymi i bez zmian, wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC) wybranych chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych w kontekście wykrywania determinant genetycznych lekooporności.

3. W związku ze wzrastającym zagrożeniem zakażeniami prątkami z MAC u ludzi i zwierząt, ustalenie, czy można przewidzieć występowanie *Mycobacterium avium* w węzłach chłonnych świń na podstawie rodzaju i wielkości stwierdzonych zmian, a także czy na prawdopodobieństwo obecności *Mycobacterium avium* w węzłach chłonnych świń wpływa płęć zwierząt oraz wielkość stada.

Wytyczone przez lek. wet. Aleksandrę Kaczmarkowską cele rozprawy były bardzo ambitne, wymagające przeprowadzenia dużej ilości badań i zbieżne z poszczególnymi etapami pracy oraz treścią publikacji stanowiących osiągnięcie.

**Rozdział 3. „Materiały i metody”** zawiera szczegółowy i bardzo starannie przygotowany opis zastosowanych metod badawczych, począwszy od izolacji i identyfikacji bakterii oraz badania ich wrażliwości na leki przeciwdrobnoustrojowe przy użyciu metod hodowlanych, poprzez badania molekularne pozwalające na wykrycie genów lekooporności w wyizolowanym DNA drobnoustrojów, aż po ocenę zróżnicowania genetycznego szczepów *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. oraz *Rhodococcus equi* z wykorzystaniem elektroforezy pulsacyjnej w zmiennym polu elektrycznym (PFGE). Doktorantka przeprowadziła także izolację, identyfikację oraz genotypowanie prątków *Mycobacterium* spp., które wymagają realizacji wieloetapowego, zupełnie odmiennego w porównaniu do ziarniaków gram-dodatnich, schematu postępowania diagnostycznego. Ilość i jakość przeprowadzonych badań, pozwala

zatem stwierdzić, że lek. wet. Aleksandra Kaczmarkowska cechuje się dużą biegłością w stosowaniu bardzo bogatego warsztatu różnych technik diagnostycznych. Na uznanie zasługuje chociażby przeprowadzenie oceny minimalnego stężenia hamującego ośmiu leków przeciwdrobnoustrojowych dla każdego z 70 badanych szczepów bakterii co daje łączną ilość 560 wykonanych testów.

Istotną i interesującą część pracy stanowiło podjęcie próby przewidywania obecności *Mycobacterium avium* w węzłach chłonnych u świń na podstawie zmian jakościowych i ilościowych widocznych podczas badania poubojowego. Należy podkreślić, iż badanie poubojowe obejmujące nacięcie podżuchwowych i krezkowych węzłów chłonnych przeprowadzono na imponującej liczbie 10 600 sztuk tusz świń, pochodzących z 83 ferm zlokalizowanych w centralnej części Polski, co przekłada się na uzyskanie grupy badawczej wysoce reprezentatywnej dla całej populacji tych zwierząt.

**Rozdział 4. „Wyniki badań”.** Przeprowadzone przez Doktorantkę badania mikrobiologiczne losowo wybranych węzłów chłonnych podżuchwowych nie wykazujących obecności zmian patologicznych (n = 113) oraz zmienionych węzłów chłonnych i narządów z widocznymi zmianami ropnymi (n = 95) wykazały, że największy odsetek wśród wyizolowanych drobnoustrojów w obu grupach badawczych stanowiły szczepy należące do rodzaju *Streptococcus* spp. (48 szczepów, co stanowiło 24,1% badanych próbek). Wykonanie testu lateksowego pozwoliło na zakwalifikowanie 14 szczepów paciorkowców do grupy serologicznej A zaś pozostałych 34 szczepów do grupy C w klasyfikacji wg Lancefielda. Wyniki badań molekularnych przy użyciu łańcuchowej reakcji polimerazy potwierdziły przynależność 45 szczepów do gatunku *S. dysgalactiae* natomiast 3 szczepów do gatunku *S. equi* subsp. *zooepidemicus*. Znaczący odsetek wszystkich wyizolowanych drobnoustrojów z węzłów chłonnych, zarówno zmienionych patologicznie jak i nie wykazujących żadnych zmian, stanowiły także szczepy *Rhodococcus equi* (17 szczepów, co stanowiło 8,5% wszystkich badanych próbek) oraz *Staphylococcus aureus* (5 szczepów, co stanowiło 2,5% wszystkich badanych próbek). Należy podkreślić, iż w badaniu wyizolowano także, choć tylko w jednym przypadku, inną bakterię o równie wysokim potencjale zoonotycznym - *Trueperellę pyogenes*. Fundamentalne znaczenie diagnostyczne posiadają wyniki badań, które potwierdziły obecność w węzłach chłonnych świń prątków należących do czterech gatunków: *Mycobacterium avium*, *M. celatum*, *M. chelonae* oraz *M. fortuitum*. Dwa gatunki spośród czterech wymienionych (*M.*



*avium* oraz *M. celatum*) były obecne zarówno w zmienionych jak i nie wykazujących żadnych zmian patologicznych węzłach chłonnych.

Badanie profili fenotypowych i genotypowych oporności na leki przeciwdrobnoustrojowe przeprowadzone przez Doktorantkę wykazało wysoki poziom skuteczności antybiotyków  $\beta$ -laktamowych wobec szczepów należących do rodzaju *Streptococcus* oraz gatunku *Staphylococcus aureus* co pozwala wnioskować, iż antybiotyki te powinny stanowić grupę leków pierwszego wyboru w leczeniu zakażeń świń wywoływanych przez te patogeny. Znaczący odsetek szczepów wyizolowanych z węzłów chłonnych u świń był natomiast odporny na erytromycynę i doksycylinę, co może wynikać z dość powszechnego stosowania tych leków u zwierząt gospodarskich. Należy podkreślić, iż w kilku przypadkach oporność fenotypowa na makrolidy i tetracykliny korelowała z obecnością u szczepów *Streptococcus dysgalactiae*, genów determinujących oporność na te grupy antybiotyków (*ermB*, *tetM* oraz *tetO*). Zupełnie odmienny profil lekowrażliwości określono dla szczepów należących do gatunku *R. equi*, które okazały się wrażliwe na antybiotyki makrolidowe zaś odporne na penicylinę.

W celu oceny pokrewieństwa genetycznego Doktorantka zastosowała metodę PFGE uznaną za „złoty standard”, ze względu na duży potencjał różnicujący wykorzystywany w typowaniu różnych grup bakterii. Wysoki poziom polimorfizmu genetycznego zanotowano w przypadku szczepów należących do dwóch gatunków: *S. dysgalactiae* (uzyskano 25 różnych pulsotypów) oraz *R. equi* (uzyskano 11 różnych pulsotypów). Niewielką natomiast różnorodność wzorów PFGE stwierdzono w przypadku szczepów należących do gatunków: *S. equi* subsp. *zooepidemicus* oraz *S. aureus*.

**Rozdział 5 "Dyskusja"** jest sprawnie prowadzonym wywodem, w którym lek. wet. Aleksandra Kaczmarkowska podjęła umiejętną próbę krytycznej analizy uzyskanych wyników w kontekście badań wykonanych przez innych autorów. Doktorantka dowiodła zdolności prowadzenia naukowej dyskusji, dokumentując tym samym dobrą znajomość badanej problematyki.

**Rozdział 6 „Wnioski”.** Dzięki realizacji założonych celów lek. wet. Aleksandrze Kaczmarowskiej udało się wyciągnąć sześć wniosków sformułowanych w logiczny i zrozumiały sposób, w pełni popartych uzyskanymi wynikami i ściśle zbieżnych z wytyczonymi celami pracy. Przeprowadzone przez Doktorantkę badania wykazały, że najczęściej izolowanymi bakteriami z węzłów chłonnych świń były szczepy należące do trzech gatunków bakterii ropotwórczych o

dużym potencjale zoonotycznym: *Streptococcus dysgalactiae*, *Rhodococcus equi* i *Staphylococcus aureus* (**Wniosek nr 1**). Doktorantka zwróciła uwagę na bardzo istotny aspekt, iż drobnoustroje chorobotwórcze wyizolowano także z węzłów chłonnych, w których nie stwierdzono zmian patologicznych, co stanowi ogromne zagrożenie dla zdrowia publicznego (**Wniosek nr 1**). Wyniki tych badań są tym bardziej niepokojące, iż zaawansowane metody badawcze wykazały wysoki stopień polimorfizmu wewnątrzgatunkowego szczególnie w przypadku szczepów należących do gatunku *S. dysgalactiae* oraz występowanie u wyizolowanych drobnoustrojów genów determinujących oporność na antybiotyki (**Wnioski nr 3 i 4**). **Wniosek nr 2** można potraktować jako przesłanie zachęcające lekarzy weterynarii do odważnego podejmowania decyzji o przeprowadzeniu dodatkowych badań diagnostycznych, zwiększając w ten sposób szansę na wykrycie zmian patologicznych w węzłach chłonnych, a tym samym wyłączenie mięsa z produkcji żywności i przerwanie transmisji zakażeń. **Wnioski nr 5 i 6** posiadają wartościowy wymiar praktyczny. Przeprowadzone badania dowiodły, iż dużą wartość prognostyczną w zakresie obecności *Mycobacterium avium* w węzłach chłonnych świń posiadają dwa parametry oceny: liczba zmian widocznych na przekroju węzłów chłonnych świń oraz określona w procentach wielkość zmienionej powierzchni ich przekroju. Natomiast ocena jakościowa zmian w węzłach chłonnych świń, płęć zwierząt oraz wielkość stada pozostają bez wpływu na szacowanie prawdopodobieństwa obecności tego patogenu.

We wniosku nr 1 wkraść się niewielki błąd w redagowaniu zdania: „Występowanie bakterii o potencjale zoonotycznym w węzłach chłonnych bez zmian jest szczególnie groźne z punktu widzenia ochrony zdrowia publicznego, uniemożliwia bowiem podjęcie podejrzenia obecności patogenów podczas badania poubojowego, czego konsekwencją jest niepobieranie materiału do badań bakteriologicznych.” W mojej opinii drugi człon zdania powinien ulec delikatnej modyfikacji i może przyjąć następującą formę: „Konsekwencją braku podejrzenia obecności patogenów w niezmienionych węzłach chłonnych u świń jest odstąpienie od dalszych czynności diagnostycznych”.

Spis piśmiennictwa liczy 104 pozycje, spośród których ponad połowa (58%) to artykuły opublikowane w czasie ostatnich 10 lat, co świadczy o aktualności i powadze podjętej tematyki badawczej.



### **Podsumowanie i wniosek końcowy**

Przedstawioną do oceny rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko. Zawarte w recenzji uwagi dotyczą etapu redagowania opracowania jako całości, mają charakter dyskusyjny i nie umniejszają wartości dzieła. Doktorantka wykazała bardzo dobre opanowanie bogatego warsztatu różnych technik diagnostycznych i dużą sprawność w realizacji badań oraz interpretacji uzyskanych wyników, co potwierdza Jej umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy badawczej. Cykl prac jest spójny tematycznie i koncepcyjnie a uzyskane wyniki badań cenne, wnoszące znaczący wkład w rozwój dyscypliny weterynaria. Wskazanie świń jako rezerwuaru drobnoustrojów chorobotwórczych o charakterze zoonotycznym oraz możliwości transmisji genów lekooporności poprzez żywność ma wymiar interdyscyplinarny, ale także międzynarodowy, o czym świadczą opublikowanie prac w renomowanych czasopismach o bardzo dużym współczynniku wpływu IF.

Podsumowując niniejszą recenzję stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. wet. Aleksandry Kaczmarkowskiej pod tytułem „Węzły chłonne świń źródłem bakterii zagrażających zdrowiu publicznemu – przesłanki do rozszerzonych badań poubojowych” odpowiada w pełni warunkom określonym w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). Przedkładam zatem Wysokiej Radzie Dyscypliny Weterynaria, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie wniosek o dopuszczenie lek. wet. Aleksandry Kaczmarkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Mariola Bochniarz, prof. uczelni

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY W LUBLINIE  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
Instytut Biologii Weterynaryjnej  
Katedra i Zakład Biologii Weterynaryjnej  
20-033 Lublin, ul. Akademicka 12  
tel. 049, 445 60 08

KR/33/2024

14529

**POLECONY**  
Potwierdzenie odbioru

**OPLATA POBRANA**  
**TAXE PERÇUE - POLOGNE**  
Umowa z Poczta Polska S.A.  
ID nr 534970/L

Prof. dr hab. Tomasz Sadkowski



szkół Główna Gospodarstwa Włókińskiego  
V Instytut Medycyny Weterynaryjnej

ul. Stourmysynowska 159  
02-776 Warszawa



R

KANCELARIA GŁÓWNA SGGW

2024 -11- 26

