



Prof. dr hab. Jarosław Bystron
Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta
Wydział Medycyny Weterynaryjnej

OCENA

rozprawy doktorskiej lek. wet. Aleksandry Kaczmarkowskiej
pt. „Węzły chłonne świń źródłem bakterii zagrażających zdrowiu
publicznemu – przesłanki do rozszerzonych badań poubojowych”

wykonanej w Katedrze Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego
Instytutu Medycyny Weterynaryjnej
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie
pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Krzysztofa Anusza
oraz promotora pomocniczego dr Annę Didkowską

Podstawę prawną wykonania recenzji rozprawy doktorskiej stanowi uchwała Rady Dyscypliny Weterynarii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie z dnia 16 października 2024 r.

Od dziesięcioleci nadzór weterynaryjny nad szeroko rozumianą produkcją żywności pochodzenia zwierzęcego pełni kluczową rolę w zapewnieniu prawidłowej ochrony zdrowia konsumentów w naszym kraju, a podstawowym jego elementem jest badanie poubojowe zwierząt rzeźnych. Badanie poubojowe obejmujące ocenę tuszy, narządów i węzłów chłonnych przez wiele lat oparte było na standardowej, obowiązkowej i trzystopniowej procedurze badania tj. oglądaniu, badaniu dotykowym i nacinaniu. Jednakże obecne przepisy prawa żywnościowego Unii Europejskiej, w odniesieniu do badania poubojowego świń, rekomendują jedynie ocenę wizualną, bez dalszego nacinania węzłów chłonnych czy narządów, co w znacznym stopniu może ograniczyć identyfikację zlokalizowanych w nich zmian patologicznych. Efektem uproszczonej procedury badania poubojowego świń może być przeoczenie zmian patologicznych i uznaniu mięsa tych zwierząt za zdatne do spożycia przez ludzi. Zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2017/625 oraz odpowiednimi przepisami wykonawczymi do tego rozporządzenia, w przypadku stwierdzenia przez urzędowych lekarzy weterynarii wykonujących badanie poubojowe świń oznak ryzyka dla zdrowia ludzi i zwierząt mają oni prawo i obowiązek rozszerzenia badania poubojowego o badania dotykowe i nacinanie. Decyzja



lekarza weterynarii o wykonaniu rozszerzonego badania poubojowego powinna być oparta na przesłankach naukowych. Istnieje zatem potrzeba, w oparciu o badania naukowe, identyfikacji nowych zagrożeń dla bezpieczeństwa żywności, które powinny stanowić dowód naukowy dla wdrożenia rozszerzonej procedury badania poubojowego świń, czego podjęła się Doktorantka. Biorąc pod uwagę powyższe fakty stwierdzam, że tematyka rozprawy doktorskiej lek. wet. Aleksandry Kaczmarkowskiej obejmuje aktualne i istotne zagadnienia w obszarze ochrony zdrowia konsumentów żywności pochodzenia zwierzęcego w krajach UE.

Recenzowaną rozprawę doktorską stanowi cykl opublikowanych trzech prac naukowych. Taką formę rozprawy doktorskiej stanowiącej zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych dopuszcza art. 187 ust. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.

Nie wliczając publikacji stanowiących „właściwą” rozprawę doktorską oraz oświadczeń Doktorantki i współautorów prac o ich udziale w powstaniu poszczególnych publikacji, przedstawiona do oceny praca doktorska liczy 68 stron. Na jej początku Doktorantka umieściła stronę tytułową, oświadczenie o autorstwie pracy, streszczenie w języku polskim i angielskim, spis treści, wykaz skrótów oraz wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską. Kolejnymi elementami pracy są: wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski i spis piśmiennictwa.

Publikacje naukowe stanowiące rozprawę doktorską zostały opublikowane w latach 2022 - 2023 w międzynarodowych i krajowych czasopismach naukowych zgodnie z poniższym zestawieniem:

1. Kaczmarkowska A., Kwiecień E., Didkowska A., Stefańska I., Rzewuska M., Anusz K.,: „The genetic diversity and antimicrobial resistance of pyogenic pathogens isolated from porcine lymph nodes”. *Antibiotics* 2023, 12(6), 1026.
(IF = 5,22, pkt. MNiSW = 70)
2. Kaczmarkowska A., Didkowska A., Brzezińska S., Klich D., Kwiecień E., Dolka I., Kociuba P., Rzewuska M., Augustynowicz-Kopec E., Anusz K.,: „Could the type and severity of gross lesions in pig lymph nodes play a role in the detection of *Mycobacterium avium*?”. *PLoS One* 2022, 17(7), e0269912.
(IF = 3,70, pkt. MNiSW = 100)



3. Kaczmarkowska A., Didkowska A., Kwiecień E., Stefańska I., Rzewuska M., Anusz K.,: „The *Mycobacterium avium* complex – an underestimated threat to humans and animals”. *Ann Agric Environ Med.* 2022, 29(1), 22-27.

(IF = 1,70, pkt. MNiSW = 100)

Łączny współczynnik wpływu (IF) wyliczony dla wyżej wymienionych prac wynosi 10,62, a zbiorcza punktacja wyliczona w oparciu o wykaz czasopism punktowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego wynosi 270 punktów. Dwie z publikacji stanowiących rozprawę doktorską to oryginalne prace doświadczalne, a trzecia publikacja jest pracą przeglądową.

Wszystkie prace mają charakter zbiorowy i zgodnie z załączonymi przez Autorkę oświadczeniami Jej wkład w powstanie każdej z prac wynosi minimum 52%. Udział Doktorantki polegał na opracowaniu koncepcji pracy i planu badań, zebraniu materiału, współudziale w wykonaniu doświadczeń, analizie i opracowaniu wyników badań, zebraniu danych literaturowych oraz przygotowaniu publikacji. Analiza dołączonych oświadczeń przez współautorów prac wskazuje jednoznacznie na dominujący udział Doktorantki na każdym etapie tworzenia poszczególnych prac.

We wstępie pracy Doktorantka scharakteryzowała aktualne przepisy prawa Unii Europejskiej odnoszące się do badania poubojowego świń, podkreślając, że obecnie rekomendowaną metodą oceny tusz trzody chlewnej są oględziny, bez dalszej oceny dotykowej i nacinania. Następnie opisała przyczyny powstawania ropnych zmian w węzłach chłonnych świń, ze szczególnym uwzględnieniem roli bakterii *Streptococcus* spp., *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus aureus* oraz *Mycobacterium avium*. W dalszej części skupiła się na omówieniu potencjału zoonotycznego powyższych drobnoustrojów, ich oporności na chemioterapeutyki oraz zagrożeniu jakie mogą stanowić dla zdrowia konsumentów. Wstęp pracy stanowi dobrze skonstruowaną całość uzasadniającą podjęcie przez Doktorantkę badań mających na celu: (1) ocenę występowania oraz zróżnicowania genetycznego potencjalnie zoonotycznych szczepów ropotwórczych *Streptococcus* spp., *R. equi* i *S. aureus* wyizolowanych z węzłów chłonnych świń ze zmianami ropnymi i bez zmian; (2) określenie dla potencjalnie zoonotycznych szczepów ropotwórczych *Streptococcus* spp., *R. equi* i *S. 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 oraz (3) w związku z wzrastającym zagrożeniem zakażeniami prątkami MAC u ludzi i zwierząt, ustalenie, czy można przewidzieć występowanie *M. avium* w węzłach chłonnych świń na podstawie rodzaju i wielkości stwierdzonych w nim zmian, a także czy na prawdopodobieństwo obecności *M. avium* w węzłach chłonnych świń wpływa płęć zwierząt oraz wielkość stada.

Z drobnych uwag uważam, że dla większej przejrzystości punktu trzeciego celu pracy należałoby pominąć „wprowadzenie”, gdyż informację, że prątki MAC stanowią wzrastające zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt Doktorantka przedstawiła już we wstępie pracy.

Rozdział „Materiał i metody” Autorka poświęciła na opis:

- sposobu pobierania do badań węzłów chłonnych z tusz zwierzęcych,
- stosowanych metod izolacji i identyfikacji bakterii *Streptococcus* spp., *R. equi* i *S. aureus*,
- oznaczania oporności izolatów *Streptococcus* spp., *R. equi* i *S. aureus* wobec wybranych ośmiu chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych przy zastosowaniu metody dyfuzji paskowej,
- izolacji DNA i wykrywania genów oporności na chemioterapeutyki,
- badania zróżnicowania genetycznego pozyskanych populacji bakterii przy wykorzystaniu elektroforezy pulsacyjnej w zmiennym polu elektrycznym (PFGE),
- klasyfikacji zmian i badań histopatologicznych węzłów chłonnych,
- izolacji i genotypowaniu bakterii *Mycobacterium* spp., a także zastosowanych analiz statystycznych służących do oceny prawdopodobieństwa występowania bakterii *M. avium* w węzłach chłonnych świń.

Metodyka została przejrzysto opisana i zaplanowana adekwatnie do założonego planu badań. Doktorantka zastosowała nowoczesne metody badawcze, szczególnie do oceny zróżnicowania genetycznego pozyskanych populacji bakterii. Na podkreślenie zasługuje także ogrom zastosowanego materiału badawczego, gdyż łącznie Doktorantka oceniła występowanie zmian w węzłach chłonnych 10 600 świń.

W części eksperymentalnej pracy lek. wet. Aleksandra Kaczmarkowska wykazała, że częstość występowania zmian gruźliczopodobnych w węzłach chłonnych świń wyniosła 0,81%. Najczęściej w analizowanych węzłach chłonnych (n = 199), zarówno ze zmianami jak i bez zmian, identyfikowała bakterie *Streptococcus* spp. (24,1%) i *R. equi* (8,5%), a najrzadziej *S. aureus* (2,5%). Najbardziej interesujące wyniki z punktu widzenia ochrony zdrowia konsumenta Doktorantka uzyskała analizując występowanie powyższych drobnoustrojów oraz bakterii *M.*



avium w węzłach chłonnych, w których nie stwierdzono zmian makroskopowych w czasie badania poubojowego. Obecność bakterii *Streptococcus* spp., *R. equi*, *S. aureus* oraz *M. avium* wykazała odpowiednio w 17, 9, 4 oraz 22 (z 113 badanych) próbkach węzłów chłonnych bez zmian.

Oceniając wrażliwość drobnoustrojów na chemioterapeutyki metodą dyfuzji paskowej Autorka wykazała, że szczepy paciorkowców są najbardziej wrażliwe na antybiotyki β -laktamowe, aminoglikozydy i fluorochinolony, a najmniej wrażliwe na makrolidy i tetracykliny. Analizując izolaty *S. aureus* wykazała, że wszystkie były wrażliwe na antybiotyki β -laktamowe, aminoglikozydy, makrolidy, tetracykliny i sulfonamidy. W przypadku izolatów *R. equi* wszystkie wykazywały wrażliwość na makrolidy, a większość na fluorochinolony i aminoglikozydy.

Analizując poziom zróżnicowania genetycznego Autorka wykazała, że wszystkie badane populacje bakterii, a szczególnie *Streptococcus dysgalactiae* i *R. equi* charakteryzowały się wysoką zmiennością genetyczną. Na podstawie analizy dendrogramu wśród szczepów *R. equi* zidentyfikowała 12 pulsotypów, a w przypadku *S. dysgalactiae* aż 25 pulsotypów. Oceniając podobieństwo genetyczne w obrębie najliczniejszej populacji bakterii tj, *S. dysgalactiae* nie wykazała znaczącej różnicy między izolatami wyisobnionymi z węzłów chłonnych ze zmianami i bez zmian makroskopowych.

W badaniach mających na celu określenie stopnia korelacji pomiędzy zmianami w węzłach chłonnych świń a obecnością w nich bakterii *M. avium* Autorka wykazała, że najbardziej precyzyjne są metody ilościowe, szczególnie oparte na wizualnej ocenie liczby zmian, jak również na analizie procentu zmian na powierzchni przekroju węzłów chłonnych.

Podsumowując rozdział „Wyniki” należy podkreślić, że wszystkie wyniki badań zostały przedstawione w sposób uporządkowany i czytelny. W pracach stanowiących rozprawę doktorską wyniki zostały zilustrowane przejrzystymi tabelami, wykresami oraz zdjęciami. Drobnym mankamentem tego rozdziału pracy jest brak jednoznacznej informacji czy w badaniach dotyczących oceny wrażliwości drobnoustrojów na chemioterapeutyki stwierdzono różnice we wrażliwości pomiędzy izolatami, szczególnie *Streptococcus* spp., pozyskanymi z węzłów chłonnych ze zmianami i bez zmian makroskopowych.

W rozdziale „Dyskusja” Doktorantka w sposób rzeczowy i dojrzały konfrontuje uzyskane wyniki badań własnych z dostępną literaturą. Rozdział ten zawiera wiele trafnych stwierdzeń i



komentarzy. Autorka wyczerpująco omawia wyniki pracy odwołując się do aktualnej literatury przedmiotu i przepisów prawa żywnościowego. Cennym elementem dyskusji, będącym jednocześnie potwierdzeniem dojrzałości i obszernej znajomości podjętej przez Doktorantkę tematyki badawczej jest Jej praca przeglądowa, w której szczegółowo opisuje występowanie i metody identyfikacji bakterii należących do *Mycobacterium avium* complex oraz zagrożenie jakie niosą te drobnoustroje dla zdrowia ludzi i zwierząt.

Wyniki badań własnych Autorka zebrała w postaci sześciu trafnych wniosków odpowiadających celom pracy. Uważam jednak, że wnioski 1 oraz 3 zawierają oprócz stwierdzeń wynikających z otrzymanych rezultatów badań, także zbyt ogólne sformułowania, które powinny być składową dyskusji.

Podsumowując stwierdzam, że oceniana praca doktorska dotyczy aktualnych i ważnych zagadnień związanych z weterynaryjną ochroną zdrowia publicznego. Istotnym osiągnięciem pracy jest wykazanie obecności ropotwórczych bakterii o potencjale zoonotycznym w niezmiennych węzłach chłonnych, a także w węzłach z pojedynczymi zmianami makroskopowymi. Warto zaznaczyć, że podczas badania poubojowego identyfikacja pojedynczych zmian makroskopowych w węzłach chłonnych wyłącznie w oparciu o ocenę wizualną, bez ich nacinania, może być bardzo utrudniona. Wyniki niniejszej rozprawy doktorskiej mają charakter aplikacyjny i stanowią naukowe uzasadnienie do podejmowania przez urzędowych lekarzy weterynarii rozszerzonej procedury badania poubojowego świń, wzbogaconej o badanie dotykowe i nacinanie węzłów chłonnych.

Ponadto ważnym nowatorskim osiągnięciem pracy doktorskiej Pani lek. wet. Aleksandry Kaczmarkowskiej jest wykazanie przydatności metod ilościowych, opartych zarówno na wizualnej ocenie liczby zmian, jak i procentowej ocenie zmienionej powierzchni przekroju węzłów chłonnych do określenia prawdopodobieństwa obecności bakterii *M. avium* w węzłach chłonnych świń.

Na uwagę zasługuje także ogrom pracy Autorki poświęcony na zebranie materiału do badań, analizę uzyskanych wyników oraz przygotowanie prac stanowiących rozprawę doktorską.

Wcześniejsze drobne krytyczne uwagi zawarte w recenzji nie umniejszają wysokiej merytorycznej wartości wyników uzyskanych przez lek. wet. Aleksandrę Kaczmarkowską.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. wet. Aleksandry Kaczmarkowskiej pt. „Węzły chłonne świń źródłem bakterii zagrażających zdrowiu publicznemu – przesłanki do



rozszerzonych badań poubojowych” spełnia ustawowe wymogi zawarte w art. 187 ust. 1 - 4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r., poz. 742). W oparciu o przedstawioną wyżej pozytywną ocenę przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Weterynarii Instytutu Medycyny Weterynaryjnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie wniosek o dopuszczenie lek. wet. Aleksandry Kaczmarkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, 03.12.2024 r.


prof. dr hab. Jarosław Bystron



UNIwersytet
Przyrodniczy
we Wrocławiu

Prof. dr hab. Jarosław Bystron

Wrocław, 03.12.2024 r.



Sz.P.

Prof. dr hab. Marcin Bańbura

Przewodniczący Rady Dyscypliny Weterynaria
SGGW w Warszawie

Szanowny Panie Profesorze

W załączeniu przesyłam recenzję rozprawy doktorskiej lek. wet. Aleksandry Kaczmarkowskiej pt. „Węzły chłonne świń źródłem bakterii zagrażających zdrowiu publicznemu – przesłanki do rozszerzonych badań poubojowych”

Z poważaniem


prof. dr hab. Jarosław Bystron