

**Ocena rozprawy doktorskiej Agaty Białuchy**  
**z tytułu**  
**“Wpływ wybranych czynników na tworzenie biofilmu przez szczepy**  
***Salmonella* spp.”**

Pałeczki *Salmonella enterica* nadal, pomimo podjęcia wielu środków zapobiegawczych w skali globalnej, stanowią przyczynę zakażeń jelitowych u ponad 93 milionów osób rocznie na całym świecie, co prowadzi w każdym kolejnym roku do około 150 tysięcy zgonów. Gatunek *Salmonella* obejmuje obecnie ponad 2500 typów serologicznych, tj. serowarów. Podobnie jak inne pałeczki Gram-ujemne jest zdolny do tworzenia biofilmu, zarówno w środowisku zewnętrznym, jak w organizmach ssaków i człowieka. Wzrost w postaci biofilmu stanowi jedną z najważniejszych strategii, zapewniających pałeczkom *Salmonella* przetrwanie w niekorzystnych dla nich warunkach, w tym w obecności środków przeciwbakteryjnych. Skutkuje to trudnościami w eradykacji pałeczek *Salmonella* z różnych środowisk ich wzrostu, np. ze skażonych powierzchni podczas procesu produkcji i dystrybucji żywności.

Wiele przesłanek wskazuje dzisiaj, że zjawisko nosicielstwa pałeczek *Salmonella* u ludzi, w tym nosicielstwa bezobjawowego, związane jest ze zdolnością tych drobnoustrojów do wzrostu w postaci biofilmu w drogach żółciowych, a zwłaszcza na powierzchni kamieni, m. in. w pęcherzyku żółciowym. Jednakże, podobnie jak u innych pałeczek Gram-ujemnych nie wszystkie szczepy *Salmonella* przejawiają zdolność do tworzenia biofilmu w każdych warunkach wzrostu. Zjawisko to zaobserwować można w laboratorium wykonując podstawowe analizy, takie jak hodowla biofilmu w płytkach polistyrenowych lub badanie morfotypów pałeczek *Salmonella* na podłożach stałych.

Oceniana rozprawa doktorska poświęcona jest właśnie analizie zdolności do tworzenia biofilmu przez szczepy *S. enterica* o określonej lekowrażliwości i pokrewieństwie genetycznym. Tworzenie biofilmu przez ten drobnoustrój badane było w zależności od różnych składników odżywczych oraz w obecności środków przeciwbakteryjnych. Analizie poddano także potencjalny związek pomiędzy

zdolnością do tworzenia biofilmu a pochodzeniem badanych szczepów *S. enterica* – od chorego lub od nosiciela. Taki postawiony cel badań jest słuszny a jego realizacja istotna dla ograniczenia szerzenia się zakażeń pałeczkami *Salmonella*. Ze względu na wysoką zapadalność, wysokie koszty leczenia i absencji związanych z zakażeniem tym drobnoustrojem, każde wyniki badań, które prowadzą do ograniczenia nosicielstwa pałeczek *Salmonella* w populacji są istotne dla zdrowia publicznego.

Wstęp teoretyczny do rozprawy doktorskiej powinien uzasadniać podjęcie założonego celu badań. W ocenianej rozprawie Pani mgr Agata Białucha w obszernym rozdziale zatytułowanym Wstęp przedstawia charakterystykę pałeczek *S. enterica*, w tym opisuje czynniki chorobotwórczości, biofilm i lekowrażliwość tego gatunku. Wstęp ten jest bardzo obszerny; mam jednak kilka uwag do jego treści: 1) lipopolisacharyd raczej nie jest adhezyną (str. 16); 2) w opisie etapów rozwoju i cech biofilmów bakteryjnych Autorka oparła się w dużej mierze na przekrojowych, aczkolwiek już nie najnowszych poglądowych publikacjach autorstwa Profesorów Krishnappa i Koltera wraz ze współautorami (odpowiednio z 2003 i 2000 roku). Proponuję zatem przed ewentualną publikacją uwzględnić nowe dane dotyczące cech charakterystycznych biofilmów, a zwłaszcza ich budowy w warunkach *in vivo*; 3) komórki przetrwałe (ang. persisters) przejawiają podwyższoną tolerancję na środki przeciwbakteryjne, natomiast nie wykazują uwarunkowanej genetycznie oporności na leki.

Dla realizacji zadań badawczych Pani Mgr Agata Białucha dobrała poprawne metody badawcze. Lekowrażliwość szczepów *S. enterica* oznaczała zgodnie z zaleceniami Europejskiego Komitetu ds. Oznaczania Lekowrażliwości (EUCAST). Pokrewieństwo genetyczne pomiędzy szczepami izolowanymi od pacjentów i nosicieli – za pomocą analizy wielkości fragmentów restrykcyjnych DNA pałeczek *Salmonella* po rozdziale w zmiennym polu elektrycznym (RFLP-PFGE) – metoda ta jest uważana jako „złoty standard” w epidemiologii molekularnej. Ocenę tworzenia biofilmu przez badane szczepy *S. enterica* prowadziła na powierzchni polistyrenu po wybarwieniu komórek bakterii i EPS za pomocą fioletu krystalicznego lub związków tetrazolowych z odczytem spektrofotometrycznym – jest to obecnie powszechnie

stosowana metoda przesiewowa w badaniach biofilmów bakteryjnych. Dla oceny istotności uzyskanych wyników Autorka zastosowała poprawne metody analizy statystycznej. Jednakże, proszę o podanie w trakcie obrony rozprawy następujących parametrów hierarchicznej analizy skupień, wykonanej dla ustalenia podobieństwa genetycznego badanych izolatów pałeczek *Salmonella*: 1) jaką zastosowano metodę do analizy skupień; 2) jaki współczynnik korelacji obliczono do oceny podobieństwa wzorów restrykcyjnych; 3) jaka była tolerancja względem położenia prążka (ang. band position tolerance)?

Przedmiot badań w omawianej rozprawie stanowiło 70 szczepów *S. enterica* wyosobnionych w Zakładzie Mikrobiologii Klinicznej Szpitala Uniwersyteckiego nr. 1 Collegium Medicum w Bydgoszczy od chorych (ponad 66%) i nosicieli z różnych materiałów klinicznych (z kału i z krwi). Ponad 85% badanych szczepów stanowiły izolaty *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis. Identyczność genetyczną wykazano za pomocą metody RFLP-PFGE tylko dla dwóch izolatów, pozostałe izolaty w dalszych badaniach traktowano jako indywidualne szczepy pałeczek *Salmonella*. Dla dziewięciu par szczepów oznaczono za pomocą zastosowanej metody statystycznej ponad 90% podobieństwo wzorów restrykcyjnych. Jednakże ze względu na niedostateczną jakość wydruku w otrzymanym egzemplarzu rozprawy, weryfikacja wyników analizy podobieństwa genetycznego badanych szczepów była dla Recenzenta trudna. Dla celów publikacyjnych z całą pewnością należy zamieścić obraz dendrogramu w znacznie wyższej rozdzielczości.

Badane izolaty pałeczek *Salmonella* w wysokim odsetku (prawie 90%) były wrażliwe na wszystkie badane antybiotyki i chemioterapeutyki analizowane zgodnie z zaleceniami EUCAST. Żaden z badanych szczepów nie wytwarzał ESBL.

Natomiast wszystkie badane szczepy przylegały w sposób trwały do powierzchni polistyrenu – ponad połowa z nich w podłożu TSB tworzyła jednak struktury uznane za Autorkę jako „słaby biofilm”. Brak dekstrozy w podłożu TSB stymulował wydajniejszą adhezję pałeczek *Salmonella* do polistyrenu. Różnice te jednak nie były istotne. Pani mgr Agata Białucha pokazała, że na wydajność adhezji i powstawania biofilmu nie miało istotnego wpływu pochodzenie badanego szczepu – czyli jego izolacja od chorego lub nosiciela. Jest to ważna obserwacja wskazująca na

podobny potencjał adhezyjny szczepów patogennych w porównaniu do szczepów przejściowych. Ciekawym byłoby też porównanie wydajności tworzenia osiadłych struktur bakteryjnych przez szczepy *S. enterica* izolowane z krwi wobec szczepów izolowanych z kału. Innym ważnym stwierdzeniem w omawianej rozprawie jest pokazanie, że wysoka dostępność substancji odżywczych (obecność glukozy w stężeniu 1%) nie stymuluje wydajniejszej adhezji i tworzenia biofilmu, a wręcz przeciwnie – może zahamować to zjawisko. Podobnie żółć wołowa w stężeniu 3% całkowicie hamuje adhezję ponad 60% badanych szczepów *S. enterica*, natomiast pozostałe szczepy tworzą osiadłe struktury tylko w bardzo słabym stopniu. Zjawisko zahamowania wydajnej adhezji i tworzenia biofilmu zaobserwowano także w obecności ampicyliny w stężeniu odpowiadającym 0,5 MIC.

Eksperymentalne wyniki uzyskane w trakcie realizacji tej pracy Pani mgr Agata Białucha krytycznie analizuje w rozdziale Dyskusja. Rozdział ten jest dobrze napisany, Autorka umiejętnie podkreśla nowe obserwacje poczynione w trakcie własnych badań na tle wyników opisanych w dostępnym piśmiennictwie. Na tej podstawie wysnuwa osiem wniosków, z których najistotniejszy i o znaczeniu praktycznym jest wniosek ostatni. Wniosek ten podkreśla wagę wielkości dawki stosowanego w klinice do leczenia zakażeń pęcherzyka żółciowego antybiotyku – ampicyliny, który powinien być podawany w takich stężeniach, aby ograniczyć rozwój biofilmu pałeczek *Salmonella* w drogach żółciowych.

Podkreślić należy też bogate piśmiennictwo przytaczane przez Autorkę (ogółem 164 pozycje) oraz wyjątkową staranność w przygotowaniu rozprawy doktorskiej. Jest ona napisana poprawnie pod względem stylistycznym a także praktycznie bezbłędnie pod względem językowym. W trakcie oceny pracy znalazłam tylko jeden (!) błąd – literówkę na str. 42. Podobnie starannie przygotowane jest 25 tabel oraz sześć rycin, przedstawiających wyniki pracy.

Podsumowując, oceniana rozprawa wnosi istotne informacje do aktualnej wiedzy o biofilmie pałeczek *Salmonella*. Jest to pierwsza praca w Polsce poświęcona temu zagadnieniu, w której przedmiotem badań były pozyskane od ludzi szczepy pałeczek *Salmonella* o określonej lekowrażliwości i potencjale epidemicznym. Uzyskane wyniki mają znaczenie praktyczne – pokazują, jak w prosty sposób można



laboratoryjnie ocenić potencjał chorobotwórczy pozyskanych izolatów pałeczek *S. enterica*, a także podatność tworzonego przez nie biofilmu na antybiotyki i chemioterapeutyki. Jest to istotne wzbogacenie potencjału analitycznego zakładu naukowego, w którym pod kierunkiem Pani Profesor Eugenii Gospodarek-Komkowskiej pracuje Doktorantka.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Agaty Białuchy spełnia zatem wszelkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z artykułem 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 z dnia 14 marca 2003 r. poz. 595, z późn. zm.). W związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie Pani mgr Agaty Białuchy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Elżbieta Trafny, prof. WAT

Centrum Inżynierii Biomedycznej IOE WAT