



WYDZIAŁ
BIOLOGII
I OCHRONY
ŚRODOWISKA



Uniwersytet
ŁÓDZKI

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii

Dr hab. **Beata Sadowska**, prof. nadzw. UŁ
Kierownik Pracowni Biologii Zakażeń
Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii
Uniwersytet Łódzki
ul. Banacha 12/16
90-237 Łódź

Łódź, 18. 05. 2016 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Agaty Białuchy pt.: „**Wpływ wybranych czynników na tworzenie biofilmu przez szczepy *Salmonella* spp.**”

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska została wykonana przez mgr Agatę Białuchę w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy pod kierunkiem Prof. dr hab. n. med. Eugenii Gospodarek-Komkowskiej.

Złożone pod względem morfologicznym i funkcjonalnym, struktury drobnoustrojów zwane biofilmami, należy uznać za jedną z dwóch podstawowych (obok planktonicznej) form życia mikroorganizmów. Wśród najważniejszych cech populacji biofilmowych rozpatrywanych w kontekście klinicznym mieści się obniżona wrażliwość na środki biostatyczne/biobójcze oraz słabsza podatność na działanie humoralnych i komórkowych mechanizmów obronnych układu odpornościowego. W związku z powyższym biofilmy odgrywają główną rolę w infekcjach o charakterze przewlekłym i nawracającym, jak zakażenia towarzyszące stosowaniu biomateriałów medycznych, zakażenia otolaryngologiczne, przewlekłe zapalenia płuc i oskrzeli, chroniczne zakażenia ran i owrzodzeń. Tworzenie przez drobnoustroje struktur biofilmu może warunkować ich przetrwanie w organizmie gospodarza i przyczyniać się do rozwoju stanu nosicielstwa patogenów, jak w przypadku wybranych serotypów pałeczek z gatunku *Salmonella enterica*, które były obiektem badań w ocenianej rozprawie doktorskiej. Tematyka poruszana w niniejszej pracy tym samym dobrze wpisuje się w nurt intensywnie prowadzonych w ostatnich latach badań nad poznaniem mechanizmów tworzenia biofilmu drobnoustrojów i czynnikami pozwalającymi na modulację tego procesu w kontekście rozwoju nowych strategii zapobiegawczych oraz terapeutycznych.

Praca mgr Agaty Białuchy obejmuje 109 stron wydruku podzielonego na rozdziały, o układzie typowym dla prac doświadczalnych, w tym 28 tabel (łącznie z obliczeniami statystycznymi), 6 rycin oraz 4 fotografie.

We **Wstępie**, przygotowanym w oparciu o dobrze dobraną literaturę, Doktorantka zawarła zagadnienia dotyczące klasyfikacji i ogólnej charakterystyki pałeczek *Salmonella* spp., ich występowania i sposobów transmisji oraz patogenezы i znaczenia klinicznego. Omawiając rezerwuary środowiskowe tych drobnoustrojów (Podrozdziały 1.3 i 1.4, str. 10-11) zabrakło mi podkreślenia faktu, iż jedynym nosicielem i tym samym źródłem najważniejszych pod względem klinicznym serowarów *Salmonella* Typhi i *S. Paratyphi* jest człowiek. Zostało to uwzględnione dopiero w Tabeli II umieszczonej na str. 12. Moim zdaniem nie powinno się również mówić o nosicielstwie ogólnie pałeczek *Salmonella* spp. w pęcherzyku żółciowym (Podrozdział 1.6, str. 12). Zjawisko to dotyczy bowiem tylko wybranych, wyżej wymienionych serotypów inwazyjnych. Odnosząc się do Podrozdziału 1.7 (str. 13), w którym opisano przebieg zakażeń z udziałem pałeczek *Salmonella* spp., z całą stanowczością pragnę podkreślić, iż proces fagocytozy nie jest realizowany przez limfocyty, co zapewne wyniknęło z niefortunnego skrótu myślowego. Tym samym proszę Doktorantkę o krótkie przedstawienie procesu fagocytozy i dalszych etapów aktywacji odpowiedzi immunologicznej na zakażenia bakteryjne. Nie mogę się również zgodzić z zaliczeniem enterocytów do komórek wychwytyjących pałeczki *Salmonella* (str. 14). Są to bowiem komórki, które ulegają biernej inwazji przez te drobnoustroje. Proszę o wyjaśnienie zjawiska czynnej i biernej inwazji komórek gospodarza przez mikroorganizmy. W sposób szczegółowy we Wstępie zostały następnie omówione najważniejsze czynniki wirulencji *Salmonella* wraz ze zdolnością tych drobnoustrojów do przeżywania i namnażania się we wnętrzu makrofagów oraz mechanizmami ich lekooporności. W związku z zakresem tematycznym pracy, w rozdziale tym opisano również zjawisko tworzenia biofilmu bakteryjnego, słusznie zwracając szczególną uwagę na czynniki środowiskowe, które mogą mieć wpływ na formowanie tych struktur przez pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*. Zwracam uwagę tylko pewną niespójność w opisie warstw biofilmu (Podrozdział 1.8.7.1, str. 23) – warstwa wewnętrzna, jak wynika choćby z samej nazwy, nie może bezpośrednio kontaktować się z powierzchnią środowiska. Proszę Doktorantkę o krótkie wyjaśnienie tej kwestii.

W rozdziale drugim pt. **Cel pracy** mgr Agata Białucha wskazuje na biofilm tworzony przez pałeczki *Salmonella* spp. na powierzchni kamieni żółciowych jako czynnik odgrywający szczególną rolę w rozwoju stanu przewlekłego nosicielstwa tych drobnoustrojów. Zjawisko to stało się więc podstawą sformułowania problemu mikrobiologicznego zawartego w temacie rozprawy oraz celu pracy, którym była analiza wybranych cech/właściwości pałeczek *S. enterica*, w tym ich podobieństwa genetycznego, lekowrażliwości i zdolności tworzenia biofilmu w różnych warunkach środowiskowych. Biorąc pod uwagę charakter epidemiologiczny ocenianej rozprawy warto byłoby w tym miejscu nadmienić, iż badaniom zostanie poddana szeroka grupa izolatów klinicznych *Salmonella* spp., pochodzących zarówno od bezobjawowych nosicieli, jak i osób chorych.

Rozdział **Materiał i metody** został przygotowany w sposób wyważony, z pominięciem nieistotnych szczegółów, ale czytelny, pozwalający na odtworzenie

przeprowadzonych doświadczeń. Na szczególne podkreślenie zasługuje bardzo przejrzyste opracowanie danych dotyczących pochodzenia szczepów (Tab. IV, str. 37, Ryc. 1, str. 38). Warto natomiast uściślić, iż po barwieniu biofilmu fioletem krystalicznym (str. 43) lub TTC (str. 46) w alkoholu etylowym rozpuszcza się nie biofilm, a powstałe i akumulowane kryształki, odpowiednio, fioletu lub formazanu. Jak wynika z opisu metody oceny wpływu subinhibicyjnych stężeń ampicyliny na tworzenie biofilmu *S. enterica* (Podrozdział 3.6, str. 45-46), najpierw w studzienkach płytek titracyjnych przez 18 godz. tworzone biofilm drobnoustrojów, a następnie (przez kolejne 18 godz.) działano na niego antybiotykiem. Wydaje się więc, iż badano nie tyle wpływ ampicyliny na tworzenie, co eradykację i dojrzewanie biofilmu. Czy Doktorantka może wytłumaczyć jakie były przesłanki do zmiany zastosowanej metodyki oceny wpływu na biofilm obecności glukozy i żółci (barwienie fioletem krystalicznym) oraz ampicyliny (metoda redukcji TTC). Proszę również o odpowiedź na pytanie czy wybrane do badań stężenia glukozy (0,5, 1 i 2%) oraz żółci (3%) mają jakieś przełożenie na warunki *in vivo*?

Rozdział **Wyniki**, który stanowi kluczowy fragment rozprawy, został przygotowany ze szczególną starannością. Na uwagę zasługują oryginalne tabele wynikowe pozwalające prześledzić uzyskane dane pod różnym kątem epidemiologicznym. Tym samym zmienność danej cechy (przykładowo tworzenia biofilmu w obecności lub bez dodatku dekstrozy w podłożu) rozpatrywano zarówno w zależności od badanego serotypu drobnoustroju, jak i od jego pochodzenia (izolacja od chorych lub nosicieli, z krwi lub kału). Ciekawym wynikiem jest ponad 90% podobieństwo genetyczne izolatów oznaczonych numerami 25 i 27, które zostały zaklasyfikowane do odmiennych serowarów, odpowiednio *S. Infantis* i *S. Enteritidis*. Proszę Doktorantkę o komentarz w tej sprawie. Zdecydowaną większość izolatów (59 z 69 badanych) stanowiły pałeczki z serotypu *S. Enteritidis*, zdolne do tworzenia w warunkach optymalnych (bakteriologiczne podłoże hodowlane) słabego lub średniego biofilmu (Tab. VIII). Wiadomo, iż szczepy *S. Enteritidis* odpowiedzialne są za rozwój głównie miejscowych zakażeń układu pokarmowego (tzw. salmonelloz). Czy zdaniem Doktorantki wykazana zdolność tworzenia biofilmu przez te drobnoustroje może mieć znaczenie kliniczne?

Zastanawiające jest połączenie w obliczeniach statystycznych wyników tworzenia biofilmu (średnie wartości absorbancji) uzyskanych dla wszystkich serowarów *S. enterica* (Obliczenie 1, str. 106). Z doświadczeń własnych wiem, iż każdy szczep, w obrębie nawet tego samego gatunku drobnoustrojów, może wykazywać inną zdolność tworzenia biofilmu. Brak wglądu w uzyskane cząstkowe wyniki absorbancji uniemożliwia mi ocenę prawidłowości przyjętego rozwiązania. Być może jednak korzystniejszym byłoby rozpatrywanie wszystkich serogrup osobno. Ponadto, porównanie tworzenia biofilmów w zależności od pochodzenia szczepów wymaga oceny różnic w dwóch układach: Chory/TSB *versus* Nosiciel/TSB oraz Chory/TSB BD *versus* Nosiciel/TSB BD, zaś w zależności od podłoża w kolejnych dwóch układach: Chory/TSB *versus* Chory/TSB BD oraz Nosiciel/TSB *versus* Nosiciel/TSB BD. Tym samym ocenie statystycznej mogły podlegać tylko 4 układy, a niekoniecznie 6 wykonanych na zasadzie porównania każdej grupy z każdą.

Kolejnym ciekawym, choć już udokumentowanym w literaturze, wynikiem jest zanik zdolności tworzenia biofilmu przez pałeczki *Salmonella* w obecności dodatku 3% żółci wołowej. Badane w pracy izolaty kliniczne należały co prawda głównie do serowaru *S.*

Enteritidis i wyniki te nie muszą mieć bezpośredniego przełożenia na przebieg zakażenia z ich udziałem. Czy znane są doniesienia dotyczące wpływu obecności żółci na tworzenie biofilmu przez serowary inwazyjne *S. Typhi* lub *S. Paratyphi* i jak w przypadku podobnych zależności tłumaczyć powiązanie zjawiska nosicielstwa tych drobnoustrojów w woreczku żółciowym z formowaniem biofilmu na powierzchni kamieni żółciowych.

Za korzystne z praktycznego punktu widzenia należy uznać wykazanie wrażliwości niemal wszystkich badanych szczepów na szeroki panel antybiotyków (n=29) zaliczanych do różnych klas. Wyjątek stanowiło 6 szczepów opornych na tikarcylinę oraz 1 szczep oporny na tikarcylinę i tikarcylinę z kwasem klawulanowym, przy jednoczesnym zachowaniu wrażliwości na pozostałe antybiotyki. Nie stwierdzono również wśród badanych izolatów zdolności do produkcji β -laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym typu ESBL, charakterystycznych dla wielu innych rodzajów pałeczek Gram-ujemnych z rodziny *Enterobacteriaceae*. Wskazuje to na dużą stabilność genomu pałeczek *Salmonella* i gwarantuje, w przypadku większości zakażeń ostrych, przebiegających z udziałem form planktonicznych tych drobnoustrojów, pozytywny efekt zastosowanej antybiotykoterapii. Problemem mogą być natomiast zakażenia o charakterze przewlekłym, jak już wspomniano związane z tworzeniem wielokrotnie bardziej opornych form biofilmu. W tym kontekście, podjęte przez mgr Agatę Białuchę, badania nad możliwością ingerencji człowieka w proces powstawania biofilmu *Salmonella* należy uznać za istotne i posiadające potencjał aplikacyjny.

W **Dyskusji** mgr Agata Białucha dokonała ostrożnej analizy uzyskanych wyników na tle dostępnych danych literaturowych. Prezentacja prac innych autorów o wynikach zarówno zbieżnych, jak i przeczących obserwacjom dokonanych w recenzowanej dysertacji, świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki i dobrej znajomości literatury z tego zakresu tematycznego. Nie do końca podzielam przekonanie Autorki, iż tworzony przez pałeczki *Salmonella* spp. biofilm „ułatwia im rozprzestrzenianie” (str. 74). Z samego założenia bowiem jest to mniej inwazyjna i wirulentna forma drobnoustrojów, nastawiona na długotrwałe przetrwanie, w tym wypadku w organizmie gospodarza. Warto by więc doprecyzować ten fragment dyskusji, tym bardziej, iż moim zadaniem rozdział ten może stać się podstawą do opracowania interesującej publikacji o charakterze epidemiologicznym.

Rozdział **Wnioski** zawiera 8 punktów, w których Autorka przedstawia swoje spostrzeżenia dotyczące przeprowadzonych badań, zwłaszcza nad czynnikami, które wpływają na tworzenie biofilmu przez pałeczki *S. enterica*. Wydaje się, iż tego typu opis byłby dobrym syntetycznym podsumowaniem części wynikowej. Natomiast wnioski powinny mieć nieco bardziej ogólny charakter i w przypadku tej pracy wskazywać na możliwość praktycznego wykorzystania uzyskanych danych.

W dysertacji wykorzystano 164 pozycje literatury, w większości opublikowane w latach 2000-2015. Wśród danych bibliograficznych znalazły się również odnośniki do stron internetowych, w tym strony Państwowego Zakładu Higieny (pozycja 22) i The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (pozycja 143) oraz do Rozporządzenia Ministra Zdrowia z 2006 r. (pozycja 119) i Ustawy o zapobieganiu i zwalczaniu zakażeń i

chorób zakaźnych u ludzi z 2008 r. (pozycja 148). Wszystkie publikacje są związane z tematyką pracy, zostały prawidłowo dobrane i zacytowane.

Praca została napisana ładnym, przyjaznym czytelnikowi językiem, jednak z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na kilka naukowo niepoprawnych lub wątpliwych sformułowań, które zaznaczyłam w otrzymanym egzemplarzu, np.: osad drobnoustrojów się zawiesza, a nie „rozcieńcza” w podłożu (str. 43), warunki środowiska mogą mieć wpływ na właściwości powierzchni drobnoustrojów, a nie „właściwości powierzchniowe” (str. 76), powierzchnia może być hydrofilowa, a nie „hydrofilna” (str. 82). Niezrozumiałym jest również zdanie: „Wytwarzanie przez bakterie różnych mechanizmów oporności na antybiotyki jednocześnie przejawia się powstaniem wysokiego poziomu oporności na fluorochinolony” (str.33). Za niewłaściwe uważam też zastosowanie przez Doktorantkę określenia „mutanty” w stosunku do enzymów produkowanych przez drobnoustroje (β -laktamaz ESBL, str. 30), które stanowią raczej inną formę/odmianę/typ enzymów podstawowych. Mam pewne zastrzeżenia, co do czytelności dendrogramu, a dokładnie wyników rozdziału elektroforetycznego chromosomalnego DNA przedstawionych na Ryc. 2 (str. 48). Być może powiększenie ryciny pozwoliłoby na większą przejrzystość zdjęć wzorów restrykcyjnych uzyskanych dla poszczególnych izolatów.

Pragnę podkreślić, iż wszelkie uwagi edytorskie nie mają jednak istotnego wpływu na ostateczną pozytywną ocenę pracy.

Wniosek końcowy

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Agaty Białuchy spełnia wszystkie wymogi formalne i merytoryczne stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna. Z pełnym przekonaniem wnioskuję do Rady Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie mgr Agaty Białuchy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

 B. Sadowska

dr hab. B. Sadowska, prof. nadzw. UŁ