



UNIwersYTET MEDYCZNY

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Katedra i Zakład Mikrobiologii

Kierownik: prof. dr hab. Grażyna Gościński

Wrocław 28.08.2015

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Bartłomieja Dudka

pt „Udział lipopolisacharydu i białek błony zewnętrznej w kształtowaniu wrażliwości pałeczek z rodzaju *Salmonella* na bakteriobójcze działanie surowicy”, której promotorem jest Pani dr hab. Gabriela Bugla-Płaskońska prof. nadzw. z Zakładu Mikrobiologii Instytutu Genetyki i Mikrobiologii Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego oraz Pan dr hab. Jacek Rybka z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu

Infekcje ludzi i zwierząt domowych, różnymi serotypami *Salmonella enteritica*, ciągle stanowią istotny problem epidemiologiczny w wielu krajach. Aktualnie niebezpieczeństwo wynikające ze zwiększonej inwazyjności niektórych serowarów *Salmonella* np. *Salmonella Enteritidis* stało się problemem na skalę światową. Zakażenie pałeczkami *Salmonella* spp. u ludzi może występować jako ostre zapalenie jelit, gorączka jelitowa, bakteriemia z lub bez objawów ogólnych. Typ chorób zależy zarówno od serotypu *Salmonella* jak i gatunku gospodarza i jego statusu immunologicznego. Przełamanie bariery odpornościowej jelita przez bakterie inwazyjne *Salmonella Enteritidis* może doprowadzić do wystąpienia objawów septycznych z uszkodzeniem zapalnym narządów wewnętrznych. Dlatego w przypadku epidemii, jak i pojedynczych zachorowań ważnym staje się znalezienie źródła zakażenia i ustalenie czy dana grupa pozornie pokrewnych przypadków jest jednorodna czy powiązana więcej niż z jednym źródłem zakażenia. Duża liczba zachorowań wywołanych przez te

drobnoustroje spowodowała, że serologiczne typowanie pałeczek *Salmonella* uznano za niewystarczające do celów dochodzenia epidemiologicznego. Dlatego bardzo ważne jest poznawanie budowy struktur powierzchniowych odpowiedzialnych za unikanie przez te bakterie odpowiedzi układu immunologicznego i umożliwiające im przetrwanie w niekorzystnym środowisku jakim jest surowica kręgowców .

Z tego względu badania prowadzone przez mgr Bartłomieja Dudka i osiągnięte rezultaty są niezwykle ciekawe i ważne, mogą także być wykorzystane praktycznie w dochodzeniach epidemiologicznych źródła zakażenia i rozprzestrzeniania się szczepów bardziej wirulentnych pałeczek *Salmonella Enteritidis* w przyrodzie.

Rozprawa doktorska pana mgr Bartłomieja Dudka jest obszerna i liczy 171 stron. Układ jest typowy dla tego typu opracowań, praca składa się z dziewięciu rozdziałów: wprowadzenia, wstępu, celu pracy, materiałów i metod, wyników, dyskusji, wniosków, abstraktu i piśmiennictwa.

Wstęp, obejmujący 35 stron przedstawiony w oparciu o bogate piśmiennictwo, głównie anglojęzyczne jest dobrym wprowadzeniem do części doświadczalnej pracy. W pierwszej części Doktorant przedstawił podział systematyczny, charakterystykę i chorobotwórczość pałeczek z rodzaju *Salmonella* ze szczególnym uwzględnieniem chorobotwórczości pozajelitowej *Salmonella Enteritidis* oraz bardzo ważne zagadnienie interakcji komórek *Salmonella* z układem immunologicznym gospodarza. W drugiej części wstępu dokładnie scharakteryzował budowę osłon komórkowych bakterii gramujemnych ze szczególnym uwzględnieniem budowy i biosyntezy LPS oraz białek błony zewnętrznej. W ostatniej części omówił występowanie i rolę kwasu sjałowego w chorobotwórczości bakterii.

Całość wstępu logicznie i przejrzysto przedstawionego świadczy o dobrej znajomości tematu i uzasadnia celowość podjętych badań.

Cel pracy zredagowany jest jasno i konkretnie wypunktowany, wymienione cele szczegółowe informują bliżej o programowanych badaniach. Głównym celem rozprawy doktorskiej było określenie udziału lipopolisacharydu i białek błony zewnętrznej w kształtowaniu wrażliwości pałeczek z rodzaju *Salmonella* na bakteriobójcze działanie surowicy

Materiały i metody to część opracowania, która definiuje sposoby i warunki prowadzenia badań a szczegółowe opisy pozwalają na obiektywną ocenę prawidłowości użytych procedur. Informacje zawarte w omawianym rozdziale świadczą nie tylko o bardzo

dobrym przygotowaniu mgr Bartłomieja Dudka do prowadzenia tego rodzaju prac badawczych, ale wskazują również na interdyscyplinarne podejście. W sposób rzeczowy i konkretny przedstawiono schematy doświadczeń, szczegółowo opisano metodykę analizy obecności kwasu sialowego u badanych szczepów *Salmonella Enteritidis* przy użyciu tandemowej spektrometrii mas sprzężonej z chromatografią gazową, proteomiczną analizę białek błony zewnętrznej czy metody pozwalające na określenie filogenetycznego pokrewieństwa badanych szczepów. Wszystkie metody, którymi posłużył się Doktorant są jasno i wyczerpująco opisane. O dociekliwości naukowej Doktoranta świadczy fakt, że wprowadził modyfikacje własne wielu wcześniej opisanych metod badawczych podyktowane logiką uzyskania bardziej wiarygodnych wyników. Ponadto w niniejszej pracy wykorzystał dwie metody barwienia żeli poliakrylamidowych w dwuwymiarowej elektroforezie białek błony zewnętrznej.

Wyniki przeprowadzonych badań zostały opisane w tekście i udokumentowane w 7 tabelach i na 28 rycinach. Przedstawienie wyników w oddzielnych tematycznie rozdziałach jest dobrym rozwiązaniem i pozwala na bardziej przejrzystą charakterystykę obszernego materiału.

Prowadzenie badań oraz ich dokumentacja nie budzą zastrzeżeń. Autor udowodnił nimi, że zrealizował założony cel badań.

Wyniki oraz logiczna dyskusja potwierdzają profesjonalizm Doktoranta w zakresie prezentacji oraz obiektywnej analizy otrzymanych wyników.

W dyskusji Doktorant konfrontuje uzyskane wyniki z doniesieniami z najnowszego i starszego, ale aktualnego piśmiennictwa. Odnosi się do wszystkich aspektów prowadzonych badań. Należy podkreślić, że badania poszukiwania kwasu sialowego w strukturach powierzchniowych szczepów *S. Enteritidis*, które wykonał doktorant są badaniami pionierskimi. Doktorant wykazał że kwas sialowy nie występuje w LPS populacji *S. Enteritidis* i że badane szczepy mogą być odporne na wysokie stężenie surowicy czyli posiadać zwiększoną predyspozycję do wywoływania infekcji. Bardzo interesująca analiza porównawcza proteinogramów badanych szczepów wykazała istotne różnice w obecności białek błony zewnętrznej co ma odbicie w zróżnicowanym stopniu pokrewieństwa filogenetycznego między szczepami.

Po szczegółowych rozważaniach w dyskusji Doktorant w drodze logicznych wywodów wysunął 6 szczegółowych wniosków o znaczeniu poznawczym i jak i klinicznym.

Przedstawiam kilka uwag które należy traktować jako polemikę z autorem rozprawy, w niczym nie umniejszającej jej niewątpliwej wartości.

- Wstęp str 22 Omawiając charakterystykę rodzaju *Salmonella* autor zbyt często stosuje określenie posiadają np. *Salmonella* posiadają zmienność antygenową, posiadają bardzo szeroki zakres gospodarzy itd. ---- -lepiej napisać *Salmonella* cechuje zmienność antygenowa czy kolonizują szeroki zakres gospodarzy
- Str 82 Skład roztworu myjącego: CH_3COOH – alkohol metylowy----- CH_3COOH – to wzór kwasu octowego natomiast CH_3OH to wzór alkoholu metylowego
- Str 141 szczepy *Salmonella*wykazują mniejszą odporność na surowicępowinno być **mniejszą oporność**
- Str 150 Wniosek 3 - białka kaskady kompetentu ----- komplementu
- Według mojej opinii w pracy zabrakło charakterystyki badanych szczepów *Salmonella Enteritidis*. Takie dane jak: wiek pacjenta od którego wyizolowano szczep, czy szczepy izolowano ze środowiska szpitalnego czy pozaszpitalnego, czy szczepy wyizolowano z ogniska zakażenia np. od członków tej samej rodziny, szkoły, data izolacji szczepu. Takie dane epidemiologiczne ułatwiłyby wyciągnięcie wniosków. Być może szczepy izolowane od dzieci do 4 roku życia i od osób w wieku podeszłym czyli grup zwiększonego ryzyka zakażeń narządowych czy posocznicy są szczepami częściej opornymi na 75% normalną surowicę ludzką i u tych szczepów częściej występują wszystkie geny wirulencji. Być może 3 szczepy odporne na działanie surowicy o identycznych profilach genetycznych pochodziły z tego samego ogniska lub od osób w podobnym wieku

Podsumowując uważam pracę za wartościową, prezentującą szeroki zakres badań zmierzających do naświetlenia podjętego tematu. Praca została wykonana rzetelnie i dobrze udokumentowana. Autor wykazał dobre przygotowanie merytoryczne, dojrzałość naukową w planowaniu, realizacji i analizie wyników badań. Stosując nowoczesne metody badań uzyskał bardzo interesujące i oryginalne wyniki, które są podstawą do poznania i zrozumienia udziału lipopolisacharydu i białek błony zewnętrznej w oporności pałeczek *Salmonella Enteritidis* na działanie surowicy. Dodatkowo prace objęte niniejszą rozprawą doktorską przyczyniły się do powiększenia Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów o 11 szczepów *Salmonella Enteritidis*. Przynależność tych szczepów do rodzaju *Salmonella* dodatkowo została potwierdzona metodą

Bruker Daltonie MALDI Biotypem. Metoda ta pozwala na wiarygodną identyfikację patogenów ludzkich jak również drobnoustrojów odzwierzęcych i środowiskowych w oparciu o unikatowy profil białkowy badanych drobnoustrojów. Praca jest dobrze napisana, literatura dobrana właściwie a sformułowane ostrożne wnioski w pełni znajdują potwierdzenie w przedstawionych wynikach badań. Ponadto zamieszczone komentarze do wniosków pokazują, że przedstawione wyniki są dopiero wstępem do dalszych badań. Jak słusznie zauważył w dyskusji doktorant praca wymaga rozszerzenia badań na większej puli szczepów.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska pt „Udział lipopolisacharydu i białek błony zewnętrznej w kształtowaniu wrażliwości pałeczek z rodzaju *Salmonella* na bakteriobójcze działanie surowicy” spełnia wymogi stawiane tego typu opracowaniom na stopień naukowy doktora.

Przekładam Radzie Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego wniosek o dopuszczenie pana mgr Bartłomieja Dudka do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie i nagrodzenie rozprawy doktorskiej.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD MIKROBIOLOGII
kierownik

prof. dr hab. Grażyna Gościńska