

**Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu**  
**Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy**  
**Wydział Farmaceutyczny**  
**Katedra Mikrobiologii**

**AUTOREFERAT**

**Dr n. med. Joanna Kwiecińska-Piróg**

Bydgoszcz, 19.10.2022

## 1. DANE WNIOSKODAWCY

Imię: Joanna  
Nazwisko: Kwiecińska-Piróg  
Dane kontaktowe: [j.kwiecinska@cm.umk.pl](mailto:j.kwiecinska@cm.umk.pl)

## 2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE

- Dyplom specjalisty mikrobiologii medycznej w diagnostyce laboratoryjnej, wydany przez Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie, 2021
- Stopień naukowy doktora nauk medycznych nadany przez Wydział Lekarski Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, 2011; uzyskany na podstawie rozprawy doktorskiej, pt.: „Ocena wytwarzania biofilmu przez pałeczki *Proteus spp.*”; promotor: dr hab. Eugenia Gospodarek, prof. UMK
- Tytuł magistra biotechnologii (specjalność biotechnologia medyczna) nadany przez Wydział Lekarski Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Bydgoszcz, 2007; uzyskany na podstawie pracy magisterskiej, pt.: „Wpływ stopnia degradacji wysypisk odpadów na obieg makroelementów w łańcuchach troficznych”; promotor: dr hab. Piotr Kamiński, prof. UMK
- Tytuł magistra analityki medycznej nadany przez Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Bydgoszcz, 2005; uzyskany na podstawie pracy magisterskiej, pt. „Właściwości hydrofobowe pałeczek z rodzaju *Proteus spp.*”; promotor: dr hab. Eugenia Gospodarek, prof. UMK

## 3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU

### 3.1. Zatrudnienie w jednostkach naukowych

2014 – obecnie Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

- adiunkt w Katedrze Mikrobiologii

2008 – 2014 Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

- asystent w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii

### 3.2. Zatrudnienie w innych jednostkach

2021 – obecnie Szpital Uniwersytecki nr 1 im. dr. Antoniego Jurasza w Bydgoszczy

- starszy asystent diagnostyki laboratoryjnej w Zakładzie Mikrobiologii Klinicznej

- 2014 – 2021 Szpital Uniwersytecki nr 1 im. dr. Antoniego Jurasza w Bydgoszczy
- młodszy asystent diagnostyki laboratoryjnej w Zakładzie Mikrobiologii Klinicznej
- 2012 – 2014 10. Wojskowy Szpital Kliniczny z Polikliniką w Bydgoszczy
- młodszy asystent diagnostyki laboratoryjnej w Zakładzie Patomorfologii

**4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. 2016 POZ. 882 ZE ZM. W DZ. U. 2016 POZ. 1311)**

**4.1. Tytuł osiągnięcia**

---

**Aktywność substancji pochodzenia naturalnego i antybiotyków  
wobec biofilmu pałeczek *Proteus* spp.**

---

**4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia**

Osiągnięcie naukowe zostało udokumentowane cyklem 5 prac opublikowanych w latach 2013-2020 w czasopiśmie ujętych w bazach: Journal Citation Reports (JCR), Web of Science i Scopus. We wszystkich wymienionych pracach jestem pierwszym autorem. Łączny współczynnik Impact Factor cyklu tych prac wynosi **IF 13,992**, a wartość punktacji **MEiN - 205**.

**H1:** **Kwiecińska-Piróg J**, Skowron K, Zniszczol K, Gospodarek E (2013): The assessment of *Proteus mirabilis* susceptibility to ceftazidime and ciprofloxacin and the impact of these antibiotics at subinhibitory concentrations on *Proteus mirabilis* biofilms. BioMed Res Int 2013: 930876, doi:10.1155/2013/930876; IF 2,706, MEiN 30

*Mój wkład w powstanie pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, przeprowadzeniu badań, analizie uzyskanych wyników, przygotowaniu artykułu oraz zredagowaniu treści manuskryptu. Udział procentowy szacuję na 85%.*

**H2:** **Kwiecińska-Piróg J**, Skowron K, Bartczak W, Gospodarek-Komkowska E (2016): The ciprofloxacin impact on biofilm formation by *Proteus mirabilis* and *P. vulgaris* strains. Jundashapur J Microbiol, 9 (4): e32656, doi: 10.5812/jjm.32656; IF 1,017, MEiN 15

*Mój wkład w powstanie pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, przeprowadzeniu badań, analizie uzyskanych wyników, przygotowaniu artykułu oraz zredagowaniu treści manuskryptu. Udział procentowy szacuję na 85%.*

**H3:** **Kwiecińska-Piróg J**, Skowron K, Bogiel T, Białucha A, Przekwas J, Gospodarek-Komkowska E (2019): Vitamin C in the presence of sub-inhibitory concentration of aminoglycosides and fluoroquinolones alters *Proteus mirabilis* biofilm inhibitory rate. Antibiotics (Basel) 11; 8 (3): 116; doi: 10.3390/antibiotics8030116; IF 3,983, MEiN 70

*Mój wkład w powstanie pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, przeprowadzeniu badań, analizie uzyskanych wyników, przygotowaniu artykułu oraz zredagowaniu treści manuskryptu. Udział procentowy szacuję na 75%.*

**H4:** **Kwiecińska-Piróg J**, Przekwas J, Majkut M, Skowron K, Gospodarek-Komkowska E (2020): Biofilm formation reducing properties of Manuka honey and propolis in *Proteus mirabilis* rods isolated

from chronic wounds. *Microorganisms* 19; 8 (11): 1823, doi: 10.3390/microorganisms8111823; IF 4,128, MEiN 20

*Mój wkład w powstanie pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, przeprowadzeniu badań, analizie uzyskanych wyników oraz zredagowaniu treści manuskryptu. Udział procentowy szacuję na 80%.*

**H5:** Kwiecińska-Piróg J, Skowron K, Śniegowska A, Przekwas J, Balcerek M, Załuski D, Gospodarek-Komkowska E (2019): The impact of ethanol extract of propolis on biofilm forming by *Proteus mirabilis* strains isolated from chronic wounds infections. *Nat Prod Res* 33 (22): 3293-3297, doi: 10.1080/14786419.2018.1470513; IF 2,158, MEiN 70

*Mój wkład w powstanie pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, przeprowadzeniu badań, analizie uzyskanych wyników, przygotowaniu artykułu oraz zredagowaniu treści manuskryptu. Udział procentowy szacuję na 70%.*

### **4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

#### **4.3.1. Wprowadzenie**

Drobnoustroje w toku swojej ewolucji wykształciły wiele form adaptacyjnych do zmieniających się warunków środowiska. Jedną z nich jest biofilm, który jest preferencyjnie tworzony przez drobnoustroje bytujące w niemal każdym środowisku [8]. Biofilm definiowany jest jako zespół komunikujących się ze sobą komórek drobnoustrojów, które otoczone są pozakomórkową macierzą. Przylegają do powierzchni biotycznych lub abiotycznych, lub do siebie wzajemnie, tworząc biomasę komórek [10].

Pierwsze naukowe informacje o biofilmie ujęte są w pracach Anthony'ego van Leeuwenhoek'a, który w listach publikowanych od września 1683 roku do czerwca 1708 roku przedstawiał ryciny zagregowanych drobnoustrojów. Pochodziły one z zeszkobin jego języka i dziąseł, a dziś określane są płytką nazębną.

Początkowo zjawisko nienazwanego jeszcze biofilmu wykazywano wyłącznie w obszarze przemysłowym. Pod koniec XIX wieku Ludwik Pasteur przypisywał skupiskom komórek bakteryjnych właściwości fermentacji octowej. W mikrobiologii wód morskich, w pierwszej połowie XX wieku, terminem „film” określano komórki zagregowane na zewnętrznej powierzchni łodzi [32].

Chociaż sam termin „biofilm” był znany w mikrobiologii środowiskowej już w 1935 roku, to w medycynie zaczął funkcjonować dopiero w drugiej połowie XX wieku. Było to wynikiem współpracy

dotyczącej sposobów ograniczania zakażeń wywołanych przez pałeczki *Pseudomonas aeruginosa* u pacjentów z mukowiscydozą, zespołów dwóch mikrobiologów: Nielsa Høiby i Billa Costertona [32]. Termin „biofilm” w 1985 roku zastąpił wykorzystywane przez Costertona określenia: „glikokaliks” lub „śluz”.

Pierwsze badania dotyczące biofilmów opierały się na obserwacjach z wykorzystaniem mikroskopów świetlnych optycznych i elektronowych. Dostarczyły one podstawowych informacji dotyczących ich fizjologii, składu i etapów tworzenia. Rozwój metod badawczych pozwala na pozyskiwanie nowych i bardziej szczegółowych informacji, m.in., na temat ich budowy.

Obecnie wiadomo, że grubość biofilmu nie przekracza 10-30 nm [13]. Składa się on z wody, macierzy pozakomórkowej oraz komórek drobnoustrojów. W objętościowym składzie biofilmu dominuje woda, stanowiąca, w zależności od rodzaju, a nawet gatunku drobnoustroju, od 70 do 97% masy biofilmu [38]. Przyjmuje ona dwie postacie: wody wolnej i wody związanej z powierzchnią komórek drobnoustrojów oraz macierzą biofilmu. Woda wolna wypełnia kanały i pory biofilmu. W kanałach pełni funkcję transportującą składniki odżywcze do wewnętrznych warstw biofilmu oraz produkty przemian metabolicznych do środowiska. Rolą wody występującej w porach biofilmu jest utrzymywanie optymalnego ciśnienia osmotycznego oraz magazynowanie, m.in., materiału genetycznego, czy enzymów wydzielanych pozakomórkowo [38].

Składnikami budującymi macierz biofilmu są zewnątrzkomórkowe polimery (ang. extracellular polymeric substances, EPS). EPS jest mieszaniną polisacharydów, białek, kwasów nukleinowych i lipidów, pochodzących z wydzielanych przez drobnoustroje zewnątrzkomórkowo enzymów, materiału genetycznego i składników wewnątrzkomórkowych uwalnianych z rozpadających się komórek. Rolą macierzy biofilmu jest stabilizacja komórek drobnoustrojów, tworzenie środowiska wzajemnych interakcji, umożliwienie komunikacji międzykomórkowej, horyzontalnego transferu genów czy ochrona przed szkodliwymi czynnikami środowiska wzrostu [10]. Macierzy biofilmu przypisuje się istotną rolę w patogenezie zakażeń. Niektóre z jej składników, np. lipazy, fibrynolizyny, Dnazy, są uznanymi czynnikami wirulencji [16]. Macierz określana jest także jako „archiwum” genetyczne [10].

Komórki drobnoustrojów w biofilmie zajmują jego najmniej liczny procentowo składnik. Objętościowo stanowią pomiędzy 0,2 a 0,4 komórki bakteryjnej na  $1 \mu\text{m}^{-3}$  biofilmu [39]. W zależności od położenia w obrębie biofilmu różnią się pomiędzy sobą, m.in., cechami fenotypowymi czy poziomem ekspresji genów. Komórki warstwy powierzchniowej mają najszybsze tempo metabolizmu, ale są najbardziej narażone na działanie czynników pochodzących ze środowiska zewnętrznego. Im komórki drobnoustrojów są bliżej powierzchni przylegania, tym wolniejszy jest ich metabolizm, zaczyna dominować metabolizm fermentacyjny, dochodzi do zmian w ekspresji genów, np. kodujących

struktury odpowiedzialne za ruch. Jest to uwarunkowane mniejszą dostępnością do składników odżywczych i tlenu oraz gromadzeniem się produktów przemian metabolicznych [8].

Tworzenie biofilmu jest procesem kilkietapowym. Jego zapoczątkowanie jest związane ze wstępnym przyleganiem drobnoustrojów do powierzchni biotycznej lub abiotycznej [6].

Adhezja bakterii lub grzybów do powierzchni, lub do siebie nawzajem, jest procesem złożonym, na który ma wpływ szereg czynników [53]. Do czynników związanych z drobnoustrojami należą: czas wstępnej adhezji, początkowe zagęszczenie drobnoustrojów i cechy morfologiczne komórek, np. składniki ściany komórkowej, obecność rzęsek czy fimbrii. Jeżeli biofilm tworzy się na powierzchni stałej, to adhezję wyznaczają również właściwości powierzchni, na której dochodzi do osiedlania się drobnoustrojów, m.in., jej ładunek, porowatość czy zdolność do zatrzymywania wody [53].

W kolejnym etapie formowania biofilmu dochodzi do namnażania komórek drobnoustrojów i ich różnicowania się. Wytwarzane są duże ilości EPS. Zaczynają tworzyć się mikrokolonie, pomiędzy którymi formują się kanały i pory. Biofilm osiąga dojrzałość.

Komórki bakteryjne dojrzałego biofilmu wykazują znacznie wyższy poziom oporności na czynniki środowiskowe, m.in., na leki przeciwdrobnoustrojowe, niż komórki planktoniczne [22]. Oporność ta jest uwarunkowana budową biofilmu. Komórki głębszych warstw są chronione przed dostępem antybiotyków i składników układu immunologicznego gospodarza przez struktury powierzchniowe biofilmu. Leki przeciwdrobnoustrojowe są wiązane przez macierz biofilmu, co ogranicza ich dyfuzję do powierzchni, na której zapoczątkowana została adhezja. Zmniejszenie dostępności tlenu i składników odżywczych w głębokich warstwach biofilmu powoduje spadek tempa metabolizmu obecnych tam komórek drobnoustrojów, przez co oddziaływanie leków przeciwdrobnoustrojowych, skutecznych wobec komórek dzielących się, jest niewystarczające do uzyskania sukcesu terapeutycznego. Ograniczenie składników odżywczych jest czynnikiem stresowym dla drobnoustrojów, powodującym zmiany w ekspresji genów, w tym tych, które warunkują wzrost oporności na leki przeciwdrobnoustrojowe. Antybiotyki są również hydrolizowane przez enzymy obecne w kanałach i porach biofilmu. Ponadto stres oksydacyjny w połączeniu z dużą gęstością komórek sprzyja horyzontalnemu przekazywaniu genów oporności na antybiotyki oraz zwiększonej częstości mutacji punktowych. W konsekwencji tych wszystkich czynników pojawia się w biofilmie populacja komórek określanych mianem komórek przetrwałych (ang. persister cells) [21]. Komórki te odpowiadają za nawrotowy charakter zakażeń związanych z występowaniem biofilmu po zakończonej antybiotykoterapii.

Jednym z mechanizmów oporności biofilmu na leki przeciwdrobnoustrojowe jest zdolność komunikowania międzykomórkowego (ang. quorum sensing, QS) [17]. Proces ten opiera się na wytwarzaniu i wydzielaniu przez komórki chemicznych cząstek, nazywanych autoinduktorami, które po osiągnięciu odpowiedniego stężenia w środowisku, przyłączają się do odpowiednich białkowych

receptorów innych komórek. Efektem tego działania są skoordynowane zmiany w ekspresji określonych genów [17]. QS bakterii Gram-dodatnich opiera się na aktywności krótkich sygnałów oligopeptydowych jako autoinduktorów i układów dwuskładnikowych zbudowanych z receptorów kinaz sensorowych połączonych z błoną cytoplazmatyczną bakterii oraz cytoplazmatycznych czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za zmianę ekspresji genów. U bakterii Gram-ujemnych rolę autoinduktorów pełnią N-acylowane laktony homoseryny (ang. acyl-homoserine lactones, AHL), będące produktem enzymów typu LuxI [36].

Za pomocą QS mogą być przekazywane sygnały dotyczące ostatniego etapu tworzenia biofilmu, tj. dyspersji. Odrywanie się komórek warstw powierzchniowych biofilmu może stanowić początek kolonizacji drobnoustrojów w innym miejscu.

Specyficzna, warstwowa budowa biofilmu, opisana powyżej, oraz jego zdolność do dyspersji są czynnikami warunkującymi jego oporność na leki przeciwdrobnoustrojowe czy składniki układu immunologicznego gospodarza, czego konsekwencją są niepowodzenia w leczeniu zakażeń.

Według Amerykańskiego Narodowego Instytutu Zdrowia (ang. The National Institutes of Health, NIH) zakażenia związane z biofilmem stanowią 65% wszystkich zakażeń i 80% zakażeń o charakterze przewlekłym [wg 13]. Zakażenia związane z obecnością biofilmu dzielą się na zakażenia przy nieobecności wszczepów oraz na zakażenia związane z ciałem obcym (biomateriałem) [7].

Zakażenia przewlekłe bez obecności biomateriału, to: zapalenia przyzębia, zakażenia ran przewlekłych i zapalenie kości i szpiku. Zakażenia związane z biomateriałem to głównie zakażenia powiązane z obecnością: cewników naczyniowych, w tym przede wszystkim cewników centralnych i dializacyjnych, protez stawów, cewników do pęcherza moczowego, sztucznych zastawek serca, rozruszników serca, soczewek kontaktowych czy implantów piersi [13].

Obecnie uważa się, że każdy gatunek bakterii i grzybów ma zdolność tworzenia biofilmu, a więc, teoretycznie każdy z nich może stanowić czynnik etiologiczny wymienionych zakażeń. Wyniki badań prowadzonych w tym temacie pozwalają stwierdzić, że różne gatunki drobnoustrojów mogą tworzyć biofilm z różną intensywnością, co przekłada się na ich udział w patogenezie zakażeń, szczególnie o charakterze przewlekłym lub związanych ze stosowaniem biomateriału.

W zakażeniach powiązanych z tworzeniem biofilmu, tj. zakażeniach ran przewlekłych, jak i w zakażeniach układu moczowego (ZUM) u pacjentów z wprowadzonym cewnikiem do pęcherza moczowego (ang. catheter-associated urinary tract infection, CAUTI), istotne znaczenie wśród czynników etiologicznych mają pałeczki Gram-ujemne, m.in., *P. aeruginosa* i *Proteus mirabilis*. Ocena zdolności tworzenia biofilmu przez pałeczki *P. mirabilis* stanowi przedmiot badań przedstawianych w pracach składających się na wnioskowane osiągnięcie habilitacyjne.

Pałeczki rodzaju *Proteus* należą taksonomicznie do wyodrębnionej w latach 2016-2017 z rzędu Enterobacteriales rodziny *Morganellaceae* [31]. W obrębie rodzaju wyróżniono obecnie 11 nazwanych



gatunków: *P. alimentorum*, *P. cibi*, *P. columbae*, *P. faecis*, *P. hauseri*, *P. inconstans*, *P. mirabilis*, *P. myxofaciens*, *P. penneri*, *P. terrae* i *P. vulgaris* [58]. Ich wspólną charakterystyczną cechą jest dimorfizm morfologiczny, który polega na zdolności zmiany kształtu komórki w zależności od środowiska wzrostu. Cecha ta stanowiła podstawę nadania nazwy dla całego rodzaju, który ma swoją etymologię w literaturze starożytnej. W „Odysei” Homera Proteus został opisany jako bóstwo morskie, posiadające zdolność przepowiadania przyszłości. Warunkiem było jego schwytanie, co było bardzo trudne ze względu na jego zdolność do przybierania różnych postaci [4].

Dimorfizm bakterii rodzaju *Proteus* polega na występowaniu dwóch postaci morfologicznych, tj. „swimming cells” i „swarming cells”. Formy te są zależne od warunków środowiska wzrostu; „swimming cells” występują w środowisku płynnym, zaś „swarming cells” – na podłożach stałych.

„Swarming cells” mogą występować u wielu gatunków bakterii, ale zwykle jest to cecha nielicznej populacji komórek danego rodzaju lub gatunku, wymagająca wilgotnego podłoża do wzrostu [12]. U pałeczek *Proteus* spp. jest to cecha charakterystyczna dla rodzaju i wyraźnie zaznaczona [40]. Komórki „swarming cells” powstają z połączenia kilku – kilkunastu komórek „swimming cells”. Poruszają się szybko po powierzchni podłoża stałego dzięki zwielokrotnionej liczbie rzęsek obecnych na powierzchni komórek w porównaniu do „swimming cells”. Różnicowanie się komórek *Proteus* spp. do „swarming cells” jest regulowane aktywacją ekspresji operonu *flhDC*, na którą wpływ ma szereg produktów innych genów, np. *umo*, *WosA*, *RppAB* czy *mrp* [30].

Zarówno „swarming cells”, jak i „swimming cells” są związane ze wzrostem mgławicowym (rozpełzłym) *Proteus* spp. i zjawiskiem „rojenia się” widocznego jako centrycznie rozchodzące się kręgi na powierzchni podłoża stałego. Wzrost mgławicowy jest ważnym czynnikiem wirulencji bakterii tego rodzaju.

Chorobotwórczość pałeczek *Proteus* spp. jest wynikiem wytwarzania przez komórki bakteryjne szeregu enzymów pozakomórkowych, np. ureazy, inwazyń, deaminaz aminokwasów, hemolizyn czy proteaz immunoglobulin, jak również wiąże się z obecnością struktur ściany komórkowej, tj. fimbrii czy pęcherzyków błonowych (ang. outer membrane vesicles, OMV) [40]. Innym uznanym czynnikiem wirulencji pałeczek *Proteus* spp. jest biofilm [40, 50]. Tworzenie biofilmu przez szczepy *Proteus* spp. jest ściśle powiązane z obecnością innych czynników wirulencji, w szczególności: ruchu mgławicowego, fimbrii, rzęsek, ureazy, otoczki polisacharydowej czy katalazy [50, 51].

Biofilm tworzony przez pałeczki *Proteus* spp. w układzie moczowym, z powodu swojego składu chemicznego jest charakterystyczny, gdyż zawiera fosforany magnezowo-amoniowe ( $MgNH_4PO_4 \times 6H_2O$ ; struwit) oraz fosforany wapnia ( $Ca_{10}(PO_4)_6 \times CO_3$ ; apatyt). Powstają one w wyniku podwyższenia pH moczu przez amoniak, będący produktem rozkładu mocznika przez ureazę wytwarzaną przez opisywane bakterie [50]. Wykazano [49], że jeśli pałeczki rodzaju *Proteus* stanowią istotny składnik mikrobioty jelitowej pacjenta, biofilm na powierzchni cewnika umieszczonego w pęcherzu moczowym

zaczyna tworzyć się już w kilka minut po jego wprowadzeniu do dróg moczowych. W ciągu kilku dni może to doprowadzić do zamknięcia jego światła [18, 45]. Proces intensywnej inkrustacji cewników wprowadzonych do pęcherza moczowego jest częstym zjawiskiem i dotyczy nawet 50% pacjentów długotrwale cewnikowanych [27].

U większości chorych długotrwale cewnikowanych, u których stwierdzono bakteriurię o etiologii *Proteus* spp., występują kamienie moczowe [45]. W ich wewnętrznych strukturach, chronione przed działaniem antybiotyków, znajdują się komórki bakteryjne, odpowiedzialne za nawracający charakter zakażeń umiejscowionych w układzie moczowym.

Badania Mathur i wsp. [28] wskazują, że proces inkrustacji cewników jest zależny od pH moczu. Aktywność ureazy pałeczek *P. mirabilis* obecnych na powierzchni cewnika wprowadzonego do pęcherza moczowego prowadzi do wzrostu pH moczu do wartości około 8,0. Wykazano, że zmiana pH moczu ogranicza inkrustację cewników [28]. Proces ten w przypadku pałeczek *P. mirabilis* jest zależny od stężenia składników mineralnych w moczu, m.in., jonów  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  lub fosforanów [47].

Kliniczne znaczenie biofilmu, jako czynnika ryzyka rozwoju lub utrzymywania się i nawrotów zakażenia, nie jest w dużej mierze określone. Jest to wynikiem rozbieżności pomiędzy naukowcami, którzy badają sam biofilm a klinicystami, którzy często nie znają lub nie doceniają jego roli w patogenezie chorób człowieka. Dowodem na to mogą być chociażby wyniki wyszukiwania tytułów publikacji w bazie PubMed na dzień 18.10.2022 roku z zakresu badań dotyczących biofilmu (21 700), czynników ryzyka (26 804) oraz obu tych zagadnień badanych razem (8 wyników).

Dotychczas nie opracowano skuteczniejszej metody eradykacji biofilmu *in situ*. Najpewniejszą metodą trwałego pozbycia się biofilmu z powierzchni biomateriału, jest jego usunięcie podczas zabiegu lub operacji, choć może on oderwać się i rozwinąć zakażenie o innym umiejscowieniu lub doprowadzić do uogólnienia procesu chorobowego. Stosuje się również nieliczne antybiotyki o potencjalnych właściwościach przeciwbiofilmowych (rifamycyny, gentamicyna) lub też biomateriały ze specjalnymi powłokami ograniczającymi przyleganie drobnoustrojów [1].

Ograniczeniem skutecznej antybiotykoterapii zakażeń z udziałem biofilmu jest przede wszystkim utrudniona penetracja antybiotyków do jego głębokich warstw. Wobec tego komórki drobnoustrojów głębszych warstw biofilmu poddawane są z reguły niższymi stężeniami antybiotyków czy związków o działaniu przeciwdrobnoustrojowym niż komórki warstwy powierzchniowej i komórki planktoniczne. Stężenia te określa się mianem stężeń sub-inhibicyjnych. Poddawanie komórek drobnoustrojów działaniu stężeń sub-inhibicyjnych ogranicza skuteczność leków przeciwdrobnoustrojowych. Może również prowadzić do selekcji szczepów opornych na stosowany antybiotyk, a nawet generować oporność na inne grupy chemiczne leków przeciwdrobnoustrojowych bądź też sprzyjać tworzeniu w populacji bakterii nowych cech – ważnych w ich przeżyciu i istotnych w patogenezie zakażeń [20,

37]. Oporność generowana sub-inhibicyjnymi stężeniami antybiotyków może być wynikiem zdolności bakterii do rekombinacji homologicznych sekwencji materiału genetycznego [23].

Prowadzone są liczne badania nad możliwościami eradykacji lub zahamowania tworzenia się biofilmów przez różne substancje, zarówno naturalne, jak i te o charakterze leczniczym. Ocena aktywności substancji pochodzenia naturalnego i antybiotyków wobec biofilmu pałeczek *Proteus* spp. była celem badań składających się na przedstawione osiągnięcie naukowe.

#### 4.3.2. Cel naukowo-badawczy

Przez ostatnie dekady uwaga badaczy koncentrowała się głównie na antybiotykach i chemioterapeutykach oraz ich oddziaływaniu wobec komórek planktonicznych. Zostały poznane, m.in., mechanizmy działania poszczególnych grup antybiotyków oraz wprowadzone modyfikacje chemiczne antybiotyków naturalnych, które poszerzają ich zakres działania. Jednak obecnie, nawet w odniesieniu do komórek planktonicznych, skuteczność antybiotyków jest często niewystarczająca. Izolowane są od pacjentów szczepy, które w badaniach *in vitro* wykazują oporność na wszystkie dostępne leki przeciwdrobnoustrojowe. Związane jest to przede wszystkim z horyzontalnym transferem genów i klonalnym rozprzestrzenianiem się szczepów z nabytymi mechanizmami oporności na antybiotyki. Oba te mechanizmy są nasilone, gdy komórki bakteryjne utworzą biofilm.

Obecność biofilmu wpływa niekorzystnie na proces diagnostyczny, jak i leczenie zakażenia. Skuteczność antybiotyków jest ograniczana nie tylko selekcją szczepów opornych, ale też samą budową biofilmu. Często zalecany czas prowadzonej terapii przeciwdrobnoustrojowej nie jest wystarczający, aby usunąć komórki warstw wewnętrznych biofilmu, co powoduje tylko tymczasowe ustąpienie objawów klinicznych zakażenia, a następnie odpowiada za jego nawrotowy charakter. Konieczne wobec tego jest określenie sposobów eradykacji biofilmu lub metod zapobiegających jego tworzeniu. Obecnie dostępne sposoby są niewystarczające lub ich działanie jest jeszcze niedostatecznie udowodnione.

W mojej pracy badawczej skupiono się na ocenie zdolności pałeczek rodzaju *Proteus* do tworzenia biofilmu, jak i do sposobów ograniczenia formowania tej struktury przez dostępne leki przeciwdrobnoustrojowe oraz substancje pochodzenia naturalnego, np. miody czy witaminy. Są to związki, które mają udowodnione działanie wobec komórek planktonicznych i są powszechnie dostępne. Ocena ich działania przeciwbiofilmowego jest istotnym zagadnieniem w kontekście współczesnych wyzwań w leczeniu zakażeń.

W przedstawionym cyklu prac można wyróżnić dwa podstawowe kierunki badań:

- A. ocena wpływu sub-inhibicyjnych stężeń cefalosporyn, aminoglikozydów i fluorochinolonów oraz ich połączeń z antyoksydantami na zdolność tworzenia biofilmu przez szczepy *Proteus* spp.,
- B. ocena wpływu produktów naturalnych pochodzenia pszczelego na ograniczenie tworzenia biofilmu przez pałeczki *P. mirabilis* izolowane z zakażeń ran przewlekłych.

#### 4.3.3. Omówienie wyników badań

Głównym tematem moich badań jest biofilm tworzony przez pałeczki rodzaju *Proteus*. Bakterie tego rodzaju mają istotne znaczenie w etiologii ZUM u pacjentów z cewnikiem wprowadzonym do pęcherza moczowego, jak również w kolonizacji i w zakażeniach ran przewlekłych. Obie postaci tych zakażeń najczęściej przebiegają z udziałem biofilmu. Z tego powodu szczepy *Proteus* spp., wykorzystywane w badaniach stanowiących niniejszy cykl, pochodzą z moczu oraz z wymazów z ran przewlekłych pobieranych od pacjentów z rozpoznaniem, odpowiednio: ZUM lub niegojącym się zakażeniem skóry/tkanki podskórnej.

##### **A. Ocena wpływu sub-inhibicyjnych stężeń cefalosporyn, aminoglikozydów i fluorochinolonów oraz ich połączeń z antyoksydantami na zdolność tworzenia biofilmu przez pałeczki *Proteus* spp.**

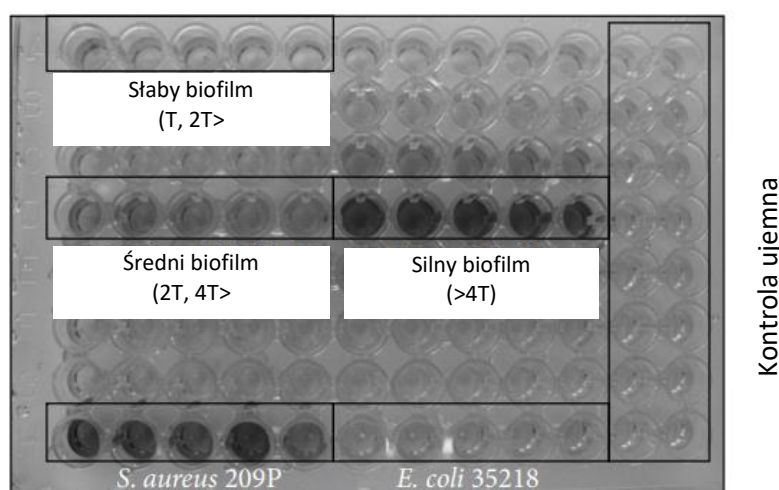
Pierwsze z badań przedstawionych w niniejszym cyklu [H1] dotyczą wpływu antybiotyków oraz związków o potencjale antyoksydacyjnym wobec biofilmu pałeczek rodzaju *Proteus*. Do badań zostały wybrane antybiotyki z dwóch różnych grup chemicznych, tj. ceftazydym (cefalosporyna III generacji) oraz ciprofloksacyna (fluorochinolon) o różnych mechanizmach działania na komórkę bakteryjną i stosowanych w leczeniu ZUM. Cefalosporyny hamują syntezę ściany komórkowej, natomiast fluorochinolony – hamują aktywność topoizomerazy, wpływając na syntezę materiału genetycznego komórki bakteryjnej.

Ocenę wpływu przedstawicieli obydwu wymienionych leków przeciwbakteryjnych, tj. ceftazydymu i ciprofloksacyny wobec biofilmu pałeczek *P. mirabilis* przedstawiono w pracy H1. Badaniem objęto 50 szczepów pałeczek z gatunku *P. mirabilis* izolowanych z moczu (25; 50,0%) i ran przewlekłych (25; 50,0%) chorych leczonych w Szpitalu Uniwersyteckim nr 1 im. dr. Antoniego Jurasza w Bydgoszczy (SU1). Każdy szczep wyosobniono od innego chorego. Wrażliwość szczepów na ceftazydym (Sigma Aldrich) i ciprofloksacynę (Sigma Aldrich) określano metodą mikrorozcieńczeń w podłożu płynnym zgodnie z metodologią Instytutu Standardów Klinicznych i Laboratoryjnych (ang. the Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) [56]. Oceniono obecność u badanych szczepów

beta-laktamaz o rozszerzonym zakresie substratowym (ang. extended spectrum beta-lactamases, ESBL) metodą synergizmu dwóch krążków (ang. double disc synergy test, DDST).

Według aktualnych wówczas kryteriów interpretacji wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost (ang. minimal inhibitory concentration, MIC) ustalonych przez Europejski Komitet Oznaczenia Antybiotyko-wrażliwości Drobnoustrojów (ang. the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) [57], wrażliwość na ceftazydym stwierdzono u 32 (64,0%) badanych szczepów, a na ciprofloksacynę – u 20 (51,3%). Zastosowanie metody DDST pozwoliło wykazać obecność ESBL u 11 (22,0%) szczepów.

W pierwszym etapie badań nad biofilmem oceniano masę biofilmu tworzonego przez badane szczepy stosując metodę wybarwiania komórek drobnoustrojów i macierzy zewnątrzkomórkowej fioletem krystalicznym. Biofilm *P. mirabilis* został utworzony w studzienkach 96-dołkowej płytki polistyrenowej (Profilab). Na podstawie uzyskanych wyników pomiaru absorbancji przy długości fali 470 nm zaszeregowano szczepy do kategorii: słabo, umiarkowanie i silnie tworzących biofilm (Ryc. 1).



Ryc. 1. Zróżnicowanie intensywności wybarwienia fioletem krystalicznym biofilmu tworzonego przez pałeczki *P. mirabilis* w studzienkach płytki 96-dołkowej (zdj. własna). T – suma absorbancji kontroli ujemnej i jej trzech odchyłeń standardowych

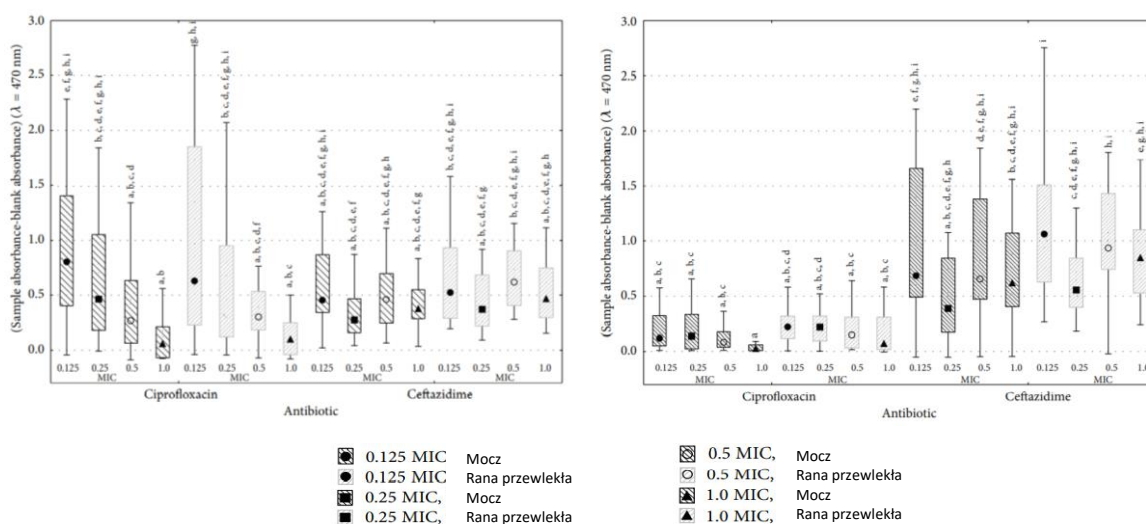
Najliczniejszą grupę (25; 50,0%) stanowiły szczepy, których biofilm wybarwił się najbardziej intensywnie, tj. absorbancja próby badanej wynosiła więcej niż czterokrotność sumy średniej absorbancji kontroli ujemnej i jej trzykrotnego odchylenia standardowego. Nie stwierdzono natomiast istotnej statystycznie różnicy w sile tworzenia biofilmu mierzonej stopniem wybarwienia fioletem krystalicznym a pochodzeniem szczepów ( $p > 0,05$ ; Bonferroni test).

Wpływ ceftazydymu i ciprofloksacyny był oceniany względem 12- i 24-godzinnego biofilmu utworzonego w studzienkach 96-dołkowych płytkach polistyrenowych (Profilab), który poddawano działaniu antybiotyków w stężeniach  $\frac{1}{8}$  MIC,  $\frac{1}{4}$  MIC,  $\frac{1}{2}$  MIC i 1 MIC. Wpływ antybiotyków na masę

biofilmu oceniano zmianami wartości absorbancji fioletu krystalicznego wybarwiającego biofilm (Ryc. 2).

Porównując wartości absorbancji dostrzeżono, że ciprofloksacyna skuteczniej eradykuje 24-godzinny biofilm *P. mirabilis* niż ceftazydym, a uzyskane różnice w wartościach absorbancji są istotne statystycznie ( $p < 0,005$ ; test Kruskal-Wallisa). Uzyskane dla każdego z badanych stężeń antybiotyków wartości absorbancji były niższe w odniesieniu do 24-godzinnego biofilmu niż biofilmu 12-godzinnego, bez względu na pochodzenie szczepu. Dla ceftazydymu wykazano odwrotną zależność i antybiotyk ten wydaje się być skuteczniejszy w ograniczaniu biofilmu *P. mirabilis* na wcześniejszym etapie jego tworzenia.

W przypadku najniższych badanych stężeń ciprofloksacyny ( $1/8$  i  $1/4$  MIC) udokumentowano niższe (0,8029 i 0,4634) średnie wartości absorbancji fioletu krystalicznego związanego z biofilmem dla szczepów izolowanych z moczu niż dla szczepów izolowanych z wymazów z ran przewlekłych (0,6292 i 0,3407). Jednak uzyskane różnice nie były istotne statystycznie ( $p > 0,05$ ).



Ryc. 2. Wpływ stężeń sub-inhibicyjnych ciprofloksacyny i ceftazydymu na 12- i 24-godzinny biofilm *P. mirabilis* (n=50). Różnymi literami alfabetu łacińskiego oznaczono wartości różniące się między sobą istotnie statystycznie (test post-hoc Bonferroni przy alfa 0,05)

Poszerzeniem tematu o zróżnicowanie gatunkowe bakterii rodzaju *Proteus* były wyniki badań przedstawione w pracy **H2**, dotyczącej oceny wpływu ciprofloksacyny na tworzenie biofilmu przez szczepy z gatunków *P. mirabilis* i *P. vulgaris*. W pracy tej badano po 20 szczepów klinicznych obydwu gatunków izolowanych od różnych pacjentów SU1, oceniając aktywność metaboliczną tworzonego przez nie biofilmu poddanego działaniu ciprofloksacyny. Szczególne istotne jest włączenie do puli szczepów badanych pałeczek z gatunku *P. vulgaris*. Jest to zdecydowanie słabiej niż *P. mirabilis* poznany gatunek tego rodzaju, mający również wiele czynników wirulencji [14]. Publikacja **H2** jest jedną z nielicznych na świecie, w której przedstawiono wyniki badań w zakresie oceny tworzenia

biofilmu przez szczepy gatunku *P. vulgaris*. Wartością dodaną tej publikacji jest analiza wrażliwości komórek planktonicznych szczepów *P. vulgaris* na ciprofloksacyne.

Badane szczepy obydwu wymienionych gatunków izolowano z moczu (5; 25,0%) oraz z wymazów z ran przewlekłych (15; 75,0%). Do oceny tworzenia biofilmu wykorzystano zdolność redukcji chlorku 2,3,5-trifenylo-tetrazoliowego (TTC, Avantor™) do formazanu. TTC, oprócz 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-carboxanilide-2H-tetrazolium (XTT) czy 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) należy do związków tetrazoliowych, które są redukowane przez aktywne metabolicznie komórki. Wykorzystanie TTC do oceny biofilmu *P. mirabilis* było przedmiotem wcześniejszych badań własnych [19]. Wyniki absorbancji biofilmów barwionych fioletem krystalicznym i TTC, porównywano z wynikami posiewów ilościowych. Uzyskano zbieżność wyników obydwu metod w klasyfikacji szczepów na podstawie poziomu absorbancji z metodą ilościową, co pozwala na zastosowanie obydwu metod w badaniach biofilmu tworzonego przez pałeczki *Proteus* spp. [19]. W niniejszych badaniach wykorzystanie w pomiarze aktywności metabolicznej biofilmu *Proteus* spp., mierzonej przyrostem absorbancji formazanu, było jednym z pierwszych na świecie.

Biofilm badanych pałeczek tworzonego w dołkach płytki polistyrenowej, poddając go działaniu antybiotyku w gradiencie stężeń. Na podstawie uzyskanych wartości absorbancji obliczano współczynniki redukcji biofilmu, które posłużyły do określenia wartości minimalnych stężeń eradykujących biofilm (ang. minimal biofilm eradication concentration, MBEC) przez 50% i 90% badanych szczepów, odpowiednio: MBEC<sub>50</sub> i MBEC<sub>90</sub>.

Na podstawie uzyskanych wyników absorbancji oceniano wartości MBEC<sub>50</sub> i MBEC<sub>90</sub> ciprofloksacyny i porównywano je z wartościami MIC<sub>50</sub> i MIC<sub>90</sub> tego leku uzyskanymi dla komórek planktonicznych. Wartości MBEC<sub>50</sub> są 16-krotnie wyższe niż wartości MIC<sub>50</sub> dla szczepów obu gatunków, zaś wartości MBEC<sub>90</sub> są 512 razy wyższe niż wartości MIC<sub>90</sub> dla szczepów *P. mirabilis* i 128 razy wyższe dla *P. vulgaris*. Niewielkie różnice w wartościach MBEC<sub>50</sub> i MIC<sub>50</sub> potwierdzają, że ciprofloksacyna wydaje się być skuteczna w eradykacji biofilmów *Proteus* spp.

Kontynuacją badań dotyczących wpływu antybiotyków na zdolność tworzenia biofilmu przez pałeczki rodzaju *Proteus* była ocena wpływu innych leków przeciwbakteryjnych i witaminy C. W publikacji **H3** przedstawiono wyniki dotyczące wpływu sub-inhibicyjnych stężeń dwóch aminoglikozydów (gentamicyny i amikacyny) i trzech fluorochinolonów (norfloksacyny, ciprofloksacyny i lewofloksacyny) oraz witaminy C na tworzenie biofilmu przez szczepy *P. mirabilis*.

Wśród antyoksydantów kwas askorbinowy ma szczególne znaczenie, a jego suplementacja jest powszechna. Witamina C została po raz pierwszy opisana w latach 20-tych XX wieku przez węgierskiego biochemika, Alberta Szent-Györgyi. Jej dzienna podaż przez dorosłego człowieka wynosi 75-1000 mg /dobę. Jest wchłaniana w jelicie cienkim z udziałem transporterów sodowo-zależnych witaminy C (ang. sodium-depend vitamin C transporters, SVCT). Jej stężenie w surowicy wynosi około 50-70 μM, zaś

w tkankach – od 200 do 2300  $\mu\text{M}$  i jest silnie zależne od rodzaju tkanki i stężenia w surowicy [35]. Większość autorów podaje, że dawka do 100 mg/dobę określana jest jako suplementacja niskimi dawkami, zaś powyżej 100 mg – wysokimi dawkami. Witamina C suplementowana w nadmiarze jest wydalana przez nerki [35].

Niedobór witaminy C jest stwierdzany w przebiegu licznych chorób. Może on wpływać na modyfikację działania układu immunologicznego poprzez wzmocnienie wytwarzania interferonu, zmniejszenie stresu oksydacyjnego, bądź na trombocytozę. Wykazano także jej działanie hamujące burzę cytokinową. Rozważa się pozytywny wpływ suplementacji wysokimi dawkami witaminy C u pacjentów w stanie krytycznym, również w przebiegu zakażeń wirusem SARS-CoV-2 [11].

Kwas askorbinowy ma powszechne zastosowanie jako suplement diety u pacjentów z nawracającym ZUM. Korzystne działanie witaminy C w tych przypadkach wiąże się z przede wszystkim z jej wpływem na pH moczu, co skutkuje zmianą środowiska wzrostu bakterii uropatogennych i ograniczeniem ich namnażania. Wyniki badań w tym temacie są rozbieżne, na co wskazują wnioski z meta-analizy przedstawione przez Noureldin [33]. Wykazano, że u pacjentów z wyjściowym wysokim pH moczu, suplementacja diety wysokimi dawkami witaminy C znacząco obniża pH moczu [33]. Zakażenie lub kolonizacja w obrębie układu moczowego pałeczkami *P. mirabilis*, jako jednego z istotnych gatunków bakterii należących do grupy uropatogenów, przebiega ze wzrostem pH moczu, co jest związane z aktywnością ureazy [42]. Wobec tego działanie witaminy C w ZUM o etiologii *P. mirabilis* może być kluczowe dla osiągnięcia korzystnego efektu terapeutycznego.

Obecnie poszukuje się metod zapobiegania lub nawet leczenia zakażeń za pomocą innych związków niż antybiotyki. Obiecujące w leczeniu ZUM wydają się być substancje lecznicze zawierające w swoim składzie bakterie probiotyczne *Lactobacillus* spp. oraz żurawinę z propolisem [24]. Działanie witaminy C w monoterapii nie zostało potwierdzone wynikami badań klinicznych, uniemożliwiając włączenie jej jako substancji leczniczej w ZUM. Z tego powodu w badaniach własnych skoncentrowano się na ocenie wpływu działania witaminy C na biofilm pałeczek *P. mirabilis*, jak również na ocenie oddziaływania witaminy C oraz antybiotyków mających zastosowanie w leczeniu ZUM.

W pracy **H3** przedstawiono wyniki badań dotyczące wpływu sub-inhibicyjnych stężeń aminoglikozydów (amikacyna i gentamicyna) i fluorochinolonów (norfloksacyna, ciprofloksacyna, lewofloksacyna) na biofilm pałeczek *P. mirabilis*. Do badań zostały włączone cztery szczepy izolowane od pacjentów z objawami ZUM leczonych w klinikach SU1, którzy byli poddawani długotrwałemu cewnikowaniu pęcherza moczowego. W pierwszym etapie badań oceniano wartość MIC badanych antybiotyków oraz kwasu askorbinowego wykorzystując metodę referencyjną, tj. metodę mikrorozcieńczeń w podłożu płynnym, wykonaną zgodnie z zaleceniami CLSI. Aminoglikozydy i fluorochinolony wybrano ze względu na ich częste stosowanie w leczeniu ZUM, zarówno w lecznictwie zamkniętym, jak i w pozaszpitalnym (fluorochinolony). W zakresie działania



przeciwdrobnoustrojowego tych leków są bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne. Ponadto często oceniane jest ich działanie przeciwbiofilmowe [52]. Wspomniane leki są stosowane w leczeniu skojarzonym z innymi antybiotykami albo aktywnymi formami leczenia zakażeń, którymi są, np. substancje powlekające cewniki do pęcherza moczowego czy suplementacja diety witaminami. Aminoglikozydy (gentamicyna) w połączeniu z niektórymi metabolitami, np. glukozą, pirogronianem, mogą wykazywać aktywność wobec komórek przetrwałych biofilmu [2].

W badaniach własnych, na podstawie wartości MIC i kryteriów interpretacji EUCAST, komórki planktoniczne wszystkich badanych szczepów *P. mirabilis* zakwalifikowano jako szczepy wrażliwe na fluorochinolony i aminoglikozydy. Wartość MIC kwasu askorbinowego dla każdego z badanych szczepów wynosiła 10,0 mg/ml.

Do oceny właściwości przeciwbiofilmowych wybrano stężenia równe wartości MIC antybiotyków wobec komórek planktonicznych oraz stężeniom sub-inhibicyjnym, tj.  $1/16$  MIC,  $1/8$  MIC,  $1/4$  MIC i  $1/2$  MIC. Dla kwasu askorbinowego uwzględniono stężenie 400  $\mu$ g/ml, gdyż, według dostępnego piśmiennictwa [43], takie stężenie jest możliwe do osiągnięcia w moczu u osób suplementujących dietę doustnymi dawkami witaminy C.

W pierwszym etapie badań oceniano wpływ kwasu askorbinowego w ww. stężeniu na zdolność tworzenia biofilmu przez badane szczepy. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w aktywności metabolicznej biofilmu wyrażonej absorbancją formazanu u szczepów klinicznych poddanych działaniu kwasu askorbinowego. Dla szczepu referencyjnego *P. mirabilis* pochodzącego z Amerykańskiej Kolekcji Szczepów Referencyjnych (ang. American Type Culture Collection®, ATCC®) zarchiwizowanego pod numerem 29906™ uzyskano wyższą aktywność metaboliczną biofilmu poddanego działaniu kwasu askorbinowego (wartość absorbancji: 0,643) niż biofilmu, który był tworzony w podłożu bez substancji suplementujących (wartość absorbancji: 0,438), ale uzyskane różnice nie były istotne statystycznie ( $p > 0,05$ ).

W kolejnym etapie oceniano wpływ uwzględnionych w badaniu antybiotyków na tworzenie biofilmu przez oceniane szczepy. W tym celu został wprowadzony współczynnik ograniczenia tworzenia biofilmu (ang. biofilm inhibitory ratio, BIR), który obliczano na podstawie pomiaru absorbancji próby badanej i kontroli dodatniej. Zastosowanie tego współczynnika pozwala na porównywanie uzyskiwanych wyników niezależnie od tempa metabolizmu poszczególnych szczepów. Współczynnik BIR przyjmował wysokie wartości, bliskie 100%, w przypadku antybiotyków dodawanych do środowiska wzrostu w stężeniach odpowiadających wartościom 1 MIC. Spośród ujętych w ocenie aminoglikozydów, amikacyna w stężeniach sub-inhibicyjnych silniej hamowała tworzenie biofilmu niż gentamicyna. Wartości BIR były niemal trzykrotnie wyższe w środowisku badanych stężeń amikacyny niż gentamicyny. Może to mieć związek z większą aktywnością amikacyny w stosunku do bakterii Gram-

ujemnych niż bakterii Gram-dodatnich, w przeciwieństwie do gentamicyny, która zastosowanie ma przede wszystkim w leczeniu zakażeń z udziałem bakterii Gram-dodatnich.

Spośród zastosowanych fluorochinolonów, norfloksacyna silniej hamowała tworzenie biofilmu przez szczepy ujęte w badaniu. Wartość współczynnika BIR norfloksacyny, nawet przy najniższym z uwzględnionych stężeń, wynosiła powyżej 70%, co świadczy o skutecznym działaniu tego chemioterapeutyku w ograniczeniu rozwoju biofilmu *P. mirabilis*. W zakresie tej aktywności mniej skuteczna wydaje się być ciprofloksacyna. Wartości współczynnika BIR przy stężeniach  $1/16$  MIC –  $1/4$  MIC przyjmowały wartości ujemne, co świadczy o potencjalnej aktywności probiofilmowej niskich stężeń tego chemioterapeutyku.

W ostatnim etapie badań przedstawionych w pracy **H3** oceniano wpływ aminoglikozydów i fluorochinolonów oraz kwasu askorbinowego na aktywność metaboliczną biofilmu. W przypadku aminoglikozydów wykazano niższe wartości współczynników BIR dla biofilmów poddawanych działaniu samych antybiotyków niż antybiotyków w połączeniu z kwasem askorbinowym. Dla najwyższych uwzględnionych w ocenie stężeń uzyskane różnice były istotne statystycznie. Pozwala to na istotne stwierdzenie, że witamina C w moczu pacjentów może ograniczać skuteczność działania samych antybiotyków.

Wartości współczynników BIR biofilmów wystawionych na działanie fluorochinolonów i kwasu askorbinowego były podobne do wartości uzyskanych dla biofilmów poddawanych działaniu samych fluorochinolonów. Może to świadczyć o braku korzyści wynikających z obecności witaminy C w moczu pacjentów leczonych fluorochinolonami w przypadku, gdy zakażenie przebiega ze spodziewanym udziałem biofilmu *P. mirabilis*. Uzyskane wyniki wymagają w przyszłości potwierdzenia w ramach badań klinicznych.

## **B. Ocena wpływu produktów naturalnych pochodzenia pszczelego na ograniczenie tworzenia biofilmu przez pałeczki *Proteus mirabilis* izolowane z zakażeń ran przewlekłych**

Kolejnym kierunkiem podjętych przeze mnie badań w stosunku do możliwości eradykacji biofilmów, była ocena wpływu produktów pochodzenia pszczelego, tj. miodu Manuka i propolisu na proces zahamowania tworzenia lub eradykacji biofilmu formowanego przez pałeczki *P. mirabilis*.

Produkty pszczele mają właściwości prozdrowotne, które są wykorzystywane od tysięcy lat. Pierwsze informacje o ich leczniczych własnościach pochodzą z epoki kamienia [9]. Do grupy produktów pszczelich należą przede wszystkim: miód, propolis, nektar, pierzga i mleczko pszczele. W swoim składzie zawierają one: węglowodany, białka, peptydy, lipidy, witaminy, minerały, polifenole, flawonoidy i terpenoidy [25].

Miody wykazują właściwości przeciwdrobnoustrojowe, co wiąże się z dużą zawartością cukrów, niskim pH i obecnością nadtlenu wodoru powstającego w wyniku działania oksydazy glukozywej

obecnej w układzie pokarmowym pszczoł [44]. Właściwości miodów są ściśle powiązane z rodzajem pożytku, lokalizacją geograficzną czy warunkami pogodowymi [46]. Na właściwości te wpływ mają również warunki przechowywania miodów, a przede wszystkim temperatura. Wykazano to także w badaniach prowadzonych we współpracy z Politechniką Bydgoską (dawniej Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. J. i J. Śniadeckich w Bydgoszczy) [26].

W badaniach własnych skoncentrowałam się na ocenie działania przeciwbiofilmowego miodu Manuka oraz etanolowego roztworu propolisu pochodzącego z Nowej Zelandii [H4 i H5].

Miód Manuka jest powszechnie uznany jako produkt o silnych właściwościach hamujących namnażanie wielu drobnoustrojów, m.in., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *P. aeruginosa* i *Escherichia coli* [15]. Wykazuje skuteczność w leczeniu uszkodzeń skóry powstałych w wyniku oparzeń. Jego silne przeciwdrobnoustrojowe właściwości są wynikiem specyficznego składu, w którym wyróżnia się, oprócz stałych składników miodów, również: metyloglioksal (ang. methylglyoxal, MGO) i leptozynę. Miód Manuka jest miodem kwiatowym, powstającym z nektaru kwiatów krzewu *Leptospermum scoparium* występującego w Nowej Zelandii. Dostępny, jako substancja o właściwościach medycznych, jest propolis, będący produktem ubocznym w czasie pożytku pszczoł na kwiatach *L. scoparium*, chociaż jego właściwości są mniej zbadane [54].

W publikacji H4 przedstawiono wyniki badań dotyczące aktywności przeciwbiofilmowej miodu Manuka oraz propolisu pochodzących z Nowej Zelandii. Badania, pozwalające scharakteryzować miód Manuka i etanolowy roztwór propolisu (ang. ethanol extract of propolis, EEP) były prowadzone we współpracy z Zakładem Zoologii i Architektury Krajobrazu Politechniki Bydgoskiej.

Do badań wybrano 31 szczepów *P. mirabilis* izolowanych z zakażeń ran przewlekłych pacjentów SU1. Na potrzeby pracy wykonano analizę epidemiologiczną zakażeń ran przewlekłych pacjentów leczonych w latach 2016 – 2018 w wymienionej placówce ochrony zdrowia. Wyniki posiewów 1142 wymazów/bioptatów pobranych z ran przewlekłych, które zgodnie z zaleceniami Konsultanta krajowego ds. mikrobiologii lekarskiej i Konsultanta krajowego ds. chirurgii ogólnej, pt. „Stosowanie antybiotyków w wybranych zakażeniach skóry i tkanek miękkich” [55], interpretowano jako dodatnie. W większości (857; 75,0%) były to hodowle mieszane. Monokultura została stwierdzona w 285 (25,0%) przypadkach. Dominującymi czynnikami etiologicznymi tych zakażeń w przypadku izolacji jednego patogenu w istotnym mianie w wymazie z rany przewlekłej były szczepy z następujących gatunków: *S. aureus* (51,2%), *P. aeruginosa* (28,4%) i *P. mirabilis* (4,2%). W zakażeniach ran przewlekłych z udziałem dwóch gatunków drobnoustrojów, najczęściej były to pary: *S. aureus* i *P. aeruginosa* (12,5%) oraz *P. aeruginosa* i *P. mirabilis* (5,9%). Łączna liczba izolatów *Proteus* spp. z tego okresu wyniosła 122. Uzyskane wyniki analizy epidemiologicznej potwierdzają dane przedstawiane w piśmiennictwie dotyczącym epidemiologii zakażeń ran przewlekłych [27].

Niepublikowane dane dotyczące oceny wyników antybiotyko-wrażliwości dostępnych (program komputerowy Promic<sup>®</sup>, Mori, Marcin Bogucki; Zakład Mikrobiologii Klinicznej SU1) dla 99 szczepów *P. mirabilis* izolowanych w analizowanym okresie, wskazują, że wszystkie szczepy *P. mirabilis* były wrażliwe na piperacylinę z tazobaktamem. Ponad 90% szczepów było wrażliwych na cefalosporyny III (ceftazydym, cefotaksym) i IV (cefepim) generacji, jak również na karbapenemy. Najwięcej szczepów było opornych na trimetoprim/sulfametoksazol (47,0%) i ciprofloksacynę (31,0%) – chemioterapeutyki często stosowane w leczeniu ambulatoryjnym zakażeń o różnym umiejscowieniu.

Do wstępnych badań włączono szczepy z ATCC<sup>®</sup> dobrane na podstawie normy PN-EN 1040:2006E, dotyczącej oceny właściwości przeciwdrobnoustrojowych związków dezynfekcyjnych i antyseptycznych: *Escherichia coli* ATCC<sup>®</sup> 25922<sup>™</sup> (ECO 25922<sup>™</sup>), *E. coli* ATCC<sup>®</sup> 35218<sup>™</sup> (ECO 35218<sup>™</sup>), *Enterococcus faecium* ATCC<sup>®</sup> 29212<sup>™</sup> (EFA 29212<sup>™</sup>), *S. aureus* ATCC<sup>®</sup> 25923<sup>™</sup> (SAU 25923<sup>™</sup>), *S. aureus* ATCC<sup>®</sup> 29213<sup>™</sup> (SAU 29213<sup>™</sup>), and *P. aeruginosa* ATCC<sup>®</sup> 27853<sup>™</sup> (PAE 27853<sup>™</sup>).

W badaniach wykorzystano dostępny komercyjnie miód Manuka MGO 400+ (Manuka Health New Zealand Limited).

W ramach podjętej współpracy badawczej z Zakładem Zoologii i Architektury Krajobrazu Politechniki Bydgoskiej metodą kolorymetryczną Folin-Ciocalteu w modyfikacji Keutgen i Pawelzik wykazano, że zawartość polifenoli w badanym miodzie wyniosła 764,3 mg/kg. Antyoksydacyjna aktywność użytego miodu Manuka, oceniana metodą pomiaru siły redukującej żelazo (ang. ferric reducing antioxidant power, FRAP), wyniosła 0,325 mmol/kg.

W badaniach wykorzystano rozcieńczenia miodu w bulionie tryptozowo-sojowym (ang. Tryptic-Soya Broth, TSB; Becton Dickinson), uzyskując końcowe stężenia: 1,9%, 3,8%, 7,5%, 15,0%, 20,0% i 30,0%.

Propolis został przygotowany w postaci EEP poprzez 14-dniową inkubację 80 g propolisu w 100 ml etanolu w temperaturze pokojowej, w zaciemnieniu. Po tym czasie roztwór poddano sedymentacji, przez 30 dni w temperaturze -20°C, której celem było wytrącenie nierozpuszczalnych składników propolisu. Tak przygotowany ekstrakt jałowiono poprzez filtrację (0,22 nm, ChemLand). Określono masę aktywnej substancji w 1 ml EEP na poziomie 0,147 g. Rozcieńczenia EEP przygotowywano, podobnie jak w przypadku miodu Manuka, w podłożu TSB, uzyskując końcowe stężenia: 1,0%, 2,5%, 5,0%, 10,0%, 20,0% i 40,0%. Stężenia te odpowiadają: 1,5 mg/ml, 3,7 mg/ml, 7,4 mg/ml, 14,7 mg/ml, 29,4 mg/ml i 58,8 mg/ml.

Prace doświadczalne rozpoczęto od oceny wartości minimalnego stężenia bakteriobójczego (ang. minimal bactericidal concentration, MBC) wobec komórek planktonicznych i stężenia bójczego wobec 24-godzinnego biofilmu (ang. biofilm bactericidal concentration, BBC) dla szczepów referencyjnych. Równocześnie oznaczano te same parametry dla etanolu jako rozpuszczalnika. Wykorzystano metodę mikrorozcieńczeń w bulionie Mueller-Hinton (ang. Mueller Hinton Broth, MHB;

Becton Dickinson) opisaną przez CLSI. Wykazano, że najniższe wartości MBC miodu Manuka (15,0%) wykazują obydwa badane szczepy *E. coli* (ATCC® 25922™, ATCC® 35218™). Wyższe wartości, tj. 20,0% stwierdzono dla ujętych w ocenie szczepów ziarenkowców Gram-dodatnich (*S. aureus* ATCC® 25923™, *S. aureus* ATCC® 29213™ i *E. faecalis* ATCC® 29212™). Najwyższą wartość MBC, zarówno miodu Manuka, jak i EEP wykazano dla szczepu *P. aeruginosa* ATCC® 27853™, odpowiednio: 25,0% i 10,0% (Tab. 1).

Tab. 1. Minimalne stężenia bójcze wobec komórek planktonicznych (ang. minimal bactericidal concentration, MBC) i biofilmu (ang. biofilm bactericidal concentration, BBC) miodu Manuka i etanolowego ekstraktu propolisu (ang. ethanol extract of propolis, EEP) otrzymane dla szczepów wzorcowych

Reference Strains	MH (v/v%)			EEP (v/v%)		
	MBC	BBC		MBC	BBC	
		0.5 MF	1:100 Dilution <sup>a</sup>		0.5 MF	1:100 Dilution <sup>a</sup>
<i>SAU</i> 25923™	20.0	20.0	15.0	5.0	20.0	40.0
<i>SAU</i> 29213™	20.0	25.0	25.0	5.0	40.0	40.0
<i>EFA</i> 29212™	20.0	25.0	25.0	5.0	20.0	20.0
<i>ECO</i> 25922™	15.0	10.0	10.0	5.0	40.0	40.0
<i>ECO</i> 35218™	15.0	10.0	10.0	5.0	20.0	40.0
<i>PAE</i> 27853™	25.0	>25.0	15.0	10.0	40.0	40.0

<sup>a</sup> 1:100 (v:v) rozcieńczenie zawiesiny w skali 0,5 MacFarlanda w TSB

SAU – *Staphylococcus aureus*, EFA – *Enterococcus faecalis*, ECO – *Escherichia coli*, PAE – *Pseudomonas aeruginosa*

Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że zarówno miód Manuka, jak i EEP mogą być stosowane miejscowo w rozcieńczeniach zachowując właściwości przeciwbiofilmowe. Jest to istotne z punktu widzenia potencjalnego zastosowania klinicznego badanych produktów. W praktyce substancje te często stosuje w postaci roztworów, a więc ich stężenia są niższe niż w produktach wyjściowych.

Oceniając wartości BBC, wykazano, że do osiągnięcia efektu bójczego miodu Manuka i EEP wobec biofilmu wymagane są z reguły wyższe stężenia niż wobec komórek planktonicznych. Jest to zgodne z oczekiwanym fenotypem oporności wynikającym z samej struktury i fizjologii biofilmów.

W celu oceny wpływu początkowego zagęszczenia komórek na właściwości przeciwbiofilmowe badanych związków, doświadczenia przeprowadzono stosując dwa początkowe inokulum badanych szczepów, tj. około  $10^8$  jednostek tworzących kolonie (j.t.k.)/ml i  $10^6$  j.t.k./ml. Nie stwierdzono znaczących różnic pomiędzy wartościami BBC w zależności od początkowej gęstości komórek. Może to mieć duże znaczenie kliniczne w przypadku zastosowania badanych produktów pszczelich w leczeniu zakażeń ran w różnym stopniu skolonizowanych przez bakterie. Wymaga to przeprowadzenia badań klinicznych, których wyniki mogłyby potwierdzić przedstawione założenie.

Do szczegółowej analizy oceny właściwości przeciwdrobnoustrojowych miodu Manuka i EEP losowo wybrano 31 szczepów *P. mirabilis* izolowanych od pacjentów SU1, które do czasu badań przechowywano w bulionie mózgowo-sercowym (ang. Brain-Heart Infusion, BHI; Becton Dickinson)

z 20% glicerolem (Avantor™) w temperaturze -70°C (Thermo Fisher Scientific™). Wartość minimalnego stężenia hamującego biofilm (ang. minimal biofilm inhibitory concentration, MBIC) oceniano wizualnie jako brak zmętnienia zawiesiny bakterii w dołkach płytki polistyrenowej (GenoPlast) zawierających uwzględnione stężenia miodu Manuka lub EEP. Stężenie zapobiegające tworzeniu się biofilmu (ang. biofilm prevention concentration, BCP) i minimalne stężenie eradykujące biofilm (ang. minimal biofilm eradication concentration, MBEC) określano metodą posiewu zawartości biofilmu usuniętego z dołków płytek polistyrenowych na stałe podłoże ubogie w elektrolity (ang. cystine-lactose-electrolyte-deficient agar, CLED; Becton Dickinson), odpowiednio dla BCP – zawiesiny pobranej z dołka, dla MBEC – zawartości dołka po usunięciu z niego komórek planktonicznych i sonikacji (40 kHz przez 10 minut; DU-4, Nickel-83 Electro). Określano również wpływ badanych produktów na aktywność metaboliczną biofilmu *P. mirabilis* metodą kolorymetryczną z TTC.

Miód Manuka w stężeniu 30,0% hamował tworzenie biofilmu większości (28; 90,3%) badanych szczepów *P. mirabilis*. Tworzenie biofilmu przez pozostałe trzy szczepy zostało zahamowane już przy stężeniu 20,0%.

Wartości BCP były wyższe od wartości MBIC. Miód Manuka w stężeniu 20,0% i niższym nie wykazywał zdolności hamujących tworzenie biofilmu wobec żadnego z badanych szczepów. Wykazano natomiast, że dla 20 (64,5%) szczepów wartości BPC miodu Manuka wyniosły 30,0%, a dla pozostałych 11 (35,5%) szczepów – ponad 30% (v/v%).

Pełnej eradykacji biofilmu pod wpływem miodu Manuka nie stwierdzono nawet przy jego najwyższym badanym stężeniu, tj. 30,0%.

Oceniając wartości MBIC, BPC i MBEC EEP, równocześnie prowadzono ocenę tych wartości dla etanolu w stężeniach odpowiadających tym występującym w EEP. Celem tego badania było określenie, czy uzyskane wyniki są efektem działania substancji czynnych zawartych w propolisie, czy też samego alkoholu.

Wartość MBIC EEP wyniosły 5,0% lub poniżej i były niższe niż wartości etanolu występujące w tych samych stężeniach w EEP. Biofilm największej liczby ujętych w doświadczeniu szczepów (17; 54,8%) był hamowany w stężeniu EEP 2,5%, a 10 (32,3%) innych szczepów – w stężeniu 1,0% i mniejszym. Tylko cztery (12,9%) szczepy *P. mirabilis* wymagały zastosowania stężenia 5,0% EEP, aby nie utworzyły biofilmu w dołkach płytki polistyrenowej.

Wobec dojrzałego biofilmu utworzonego przez 21 (67,7%) szczepów *P. mirabilis*, EEP wykazywał właściwości eradykujące w stężeniu 10,0%. Dla 7 (22,6%) szczepów wartość EEP wyniosła 5,0%, a dla pozostałych trzech (9,7%) – 20,0%. Etanol eradykował biofilm w znacznie szerszym przedziale stężeń, tj. od 1,0% (3; 9,7%) do 40,0% (6; 19,3%). Dla trzech (9,7%) szczepów nie oceniono wartości MBEC etanolu, gdyż była ona wyższa niż najwyższe oceniane stężenie, tj. ponad 40,0%.

Innym celem tego obszaru badawczego było określenie aktywności metabolicznej dojrzałego biofilmu *P. mirabilis* poddanego działaniu miodu Manuka i EEP. W celu porównania wyników pomiędzy sobą posłużono się wskaźnikiem redukcji aktywności metabolicznej, obliczanym jako iloraz różnicy wartości absorbancji kontroli dodatniej i próby badanej do wartości absorbancji kontroli dodatniej.

Aby określić istotność statystyczną różnic pomiędzy aktywnością metaboliczną biofilmu poddawanego działaniu badanego związku a kontrolą dodatnią (biofilm tego samego szczepu, tworzony w samym podłożu namnażającym), posłużono się wartościami absorbancji skorelowanymi o wartości tła. Wykazano, że miód Manuka w każdym badanym stężeniu hamuje aktywność metaboliczną dojrzałego biofilmu *P. mirabilis* i są to różnice istotne statystycznie (test Wilcoxon,  $p=0,002$  dla stężenia 1,9%,  $p<0,001$  dla stężeń z zakresu 3,6% - 30,0%).

Wykazano, że EEP hamuje aktywność metaboliczną biofilmu w stężeniach powyżej 2,5%. W stężeniu 1,0% EEP wykazano spadek współczynnika redukcji aktywności metabolicznej biofilmu *P. mirabilis* do wartości ujemnych. Oznacza to, że te stężenia EEP stymulują aktywność metaboliczną komórek biofilmu, chroniąc biofilm przed działaniem samego alkoholu, który w stężeniu odpowiadającym stężeniu w EEP wykazywał zdolność do redukcji aktywności metabolicznej biofilmu *P. mirabilis*. Silniejsze niż EEP działanie etanolu na zahamowanie aktywności metabolicznej notowano w stężeniach z zakresu 1,0% - 10,0% EEP. W stężeniach 20% i 40% EEP wykazywano wyższe współczynniki redukcji aktywności metabolicznej biofilmu pod wpływem EEP (odpowiednio: 105,0%; 116,9%) niż po działaniu samego etanolu (odpowiednio: 93,1%; 90,7%), a uzyskane różnice są istotne statystycznie (odpowiednio:  $p<0,002$ ;  $p<0,001$ ).

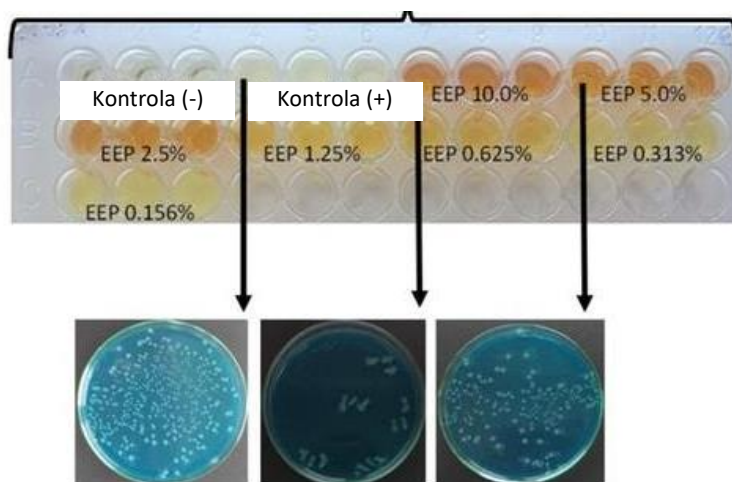
Propolis i jego roztwory cechuje różnorodność właściwości, co jest uwarunkowane jego składem chemicznym, a przede wszystkim zawartością flawonoidów. Mogą one stanowić do 50% składu propolisu, a ich różnorodność wiąże się ze specyficznymi cechami propolisów. W badaniach tych produktów pszczelich pochodzących z odmiennych regionów świata wykazano, że wszystkie jego badane próbki zawierają w składzie kwas p-kumarowy i kwas ferulowy [34].

W celu oceny składu chemicznego wykorzystywanego w badaniach własnych EEP nawiązałam współpracę z badaczami Katedry Botaniki Farmaceutycznej i Farmakognozji Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu (CM UMK) [H5]. Za pomocą cienkowarstwowej analizy chromatograficznej (ang. thin layer chromatography, TLC) wykazano, że analizowany EEP w swoim składzie zawiera 6 z 10 ocenianych flawonoidów, tj. kwasy: chlorogenowy, p-kumarowy, ferulowy, kawowy, wanilinowy i salicylowy. W śladowych ilościach wykazano również obecność kwasu hydroksycynamonowego. Natomiast nie stwierdzono obecności kwasu galusowego, syryngowego i synapinowego. Flawonoidy mogą mieć zastosowanie w pielęgnacji i leczeniu miejscowym ran przewlekłych [3].

Aby ocenić działanie przeciwbiofilmowe składników propolisu, eliminując wpływ alkoholu stanowiącego rozpuszczalnik, przeprowadzono kolejne badanie, w którym określano wpływ EEP w stężeniach 1,56 – 100 mg/ml wobec tworzącego się biofilmu przez 7 szczepów *P. mirabilis* izolowanych od pacjentów z rozpoznaniem klinicznym rany przewlekłej, od których do badań mikrobiologicznych pobrano wymaz z zakażonej rany. Równolegle oceniano wpływ na biofilm etanolu stanowiącego rozpuszczalnik dla propolisu.

Zastosowano metodę ilościową. Zaletą tej metody jest jej wysoka czułość. Jest to jedno z nielicznych dostępnych badań, w których wykorzystano tak pracochłonną metodę. W opisach metodologii wielu badań, w których substancją badaną jest propolis, wykorzystuje się metody dyfuzji badanych substancji z dołków wykonanych w podłożu lub metody krążkowo-dyfuzyjne, w których krążki nasączano badanym związkiem. Metody te charakteryzuje ryzyko błędów polegające na ograniczeniach w dyfuzji niektórych składników stosowanych substancji, jak też w uzyskaniu jednorodnego stężenia badanej substancji w bibułowym krążku.

W końcowym etapie każdego badania dołki płytki poddawano sonikacji (40 kHz przez 10 minut). Po sonikacji zawartość każdego dołka płytki, w której biofilm traktowano EEP, przenoszono do jałowego roztworu soli fizjologicznej zbuforowanego fosforanami (ang. phosphate buffered saline, PBS) i wykonywano szereg 10-krotnych rozcieńczeń. Każde z rozcieńczeń wysiewano na podłoże CLED, które umożliwia ocenę j.t.k. przy zahamowaniu wzrostu mgławicowego badanych szczepów bakterii (Ryc. 3).



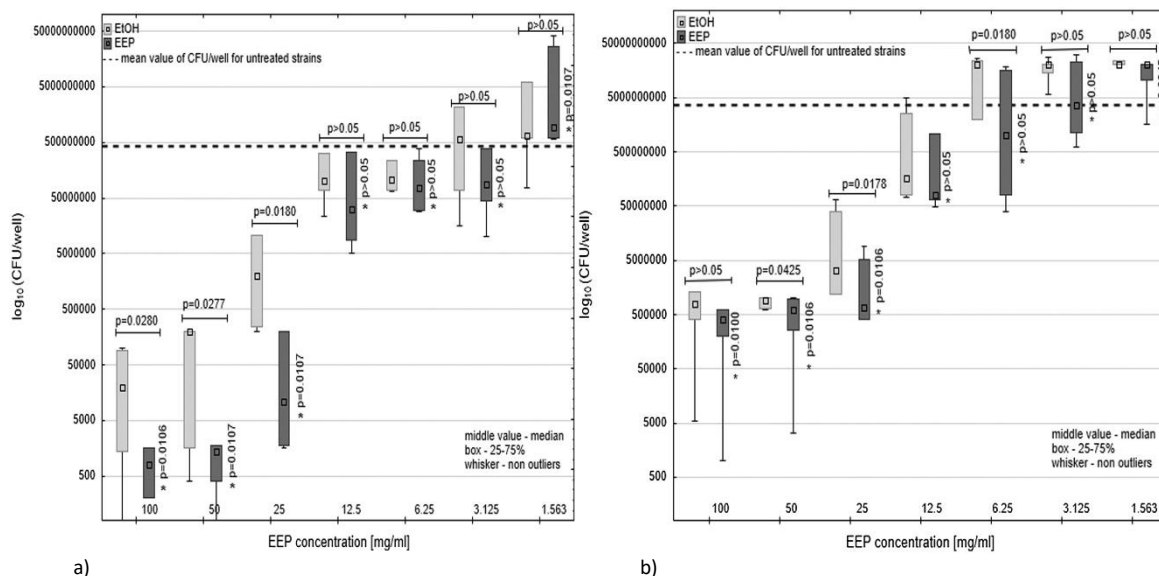
Ryc. 3. Schemat przebiegu badań wykorzystanych w publikacji H5 (EEP – etanolowy roztwór propolisu) (zdj. własne)

Stwierdzono, że EEP w stężeniach 25 – 100 mg/ml redukuje tworzenie biofilmu przez badane szczepy *P. mirabilis*. Jest to cecha niezależna od obecności rozpuszczalnika, gdyż liczba komórek



izolowanych z biofilmu poddanego działaniu wyłącznie etanolu była wyższa niż z biofilmu poddanego działaniu EEP (Ryc. 4 a).

W najniższych stężeniach EEP wykazano promujący wzrost *P. mirabilis* w postaci biofilmu. Jest to prawdopodobnie związane z obecnością składników odżywczych zawartych w EEP, które są niewystarczające do uzyskania efektu bakteriostatycznego lub bakteriobójczego, a sprzyjają bardziej intensywnemu namnażaniu się komórek bakteryjnych w biofilmie.



Ryc. 4. Wpływ EEP i jego rozpuszczalnika (etanol, EtOH) na a) tworzenie biofilm i b) redukcję biofilmu *P. mirabilis*

Badania przeprowadzono także wobec dojrzałego biofilmu pałeczek *P. mirabilis* utworzonego w dołkach płytki polistyrenowej. W tym celu, 200  $\mu\text{l}$  zawiesiny bakterii w podłożu TSB o gęstości  $6 \times 10^6$  j.t.k./ml zostało umieszczone w dołkach płytki i poddane namnażaniu w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ . Po 24 godzinach inkubacji usunięto komórki planktoniczne, a biofilm związany z powierzchnią dołków 5-krotnie przemywano jałowym roztworem PBS (Avantor™). Przemyty z pozostałości podłoża odżywczego oraz komórek planktonicznych biofilm poddawano działaniu EEP w zakresie stężeń 1,56 – 100 mg/ml przez dobę. Po tym czasie usuwano zawiesinę bakterii z dołków płytki, biofilm ponownie przemywano jałowym roztworem PBS. W kolejnym etapie doświadczenia dołki płytek uzupełniano 200  $\mu\text{l}$  jałowego roztworu PBS. Płytki zaklejano jałowym parafilmem i poddawano sonikacji (40 kHz przez 10 minut). Uzyskany sonikat rozcieńczano w PBS w szeregu rozcieńczeniowym. Każde z rozcieńczeń wysiewano na podłoże CLED w objętości 100  $\mu\text{l}$ /płytkę. Hodowle posiewów prowadzono w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  przez 24 godziny. Po tym czasie zliczano kolonie, a wynik przeliczano na liczbę j.t.k./dołek płytki.

W przypadku dojrzałego biofilmu stwierdzono, że EEP skutecznie eradykuje biofilm w stężeniach 12,5 – 100 mg/ml (Ryc. 4b). Wykazano jednak, że przy zastosowaniu najwyższego z nich (100 mg/ml),

różnica pomiędzy działaniem rozpuszczalnika a EEP jest nieistotna statystycznie. Zatem, nie można jednoznacznie stwierdzić, że działanie przeciwbiofilmowe EEP w tym stężeniu jest zależne od właściwości propolisu. W stężeniach propolisu 25,0 i 50,0 mg/ml statystycznie istotnie mniej komórek izolowano z biofilmu poddanego działaniu EEP niż samego rozpuszczalnika w stężeniu odpowiadającym stężeniu w EEP, co pozwala stwierdzić, że skuteczność EEP w tych stężeniach zależy od właściwości propolisu.

Po spostrzeżeniu, że wyższe stężenia EEP ograniczają tworzenie biofilmu i redukują jego już powstałą masę, skoncentrowano się na porównaniu działania najwyższych stężeń EEP i powszechnie stosowanych lawaseptyków.

W publikacji **H5** przedstawiono wyniki oceny wpływu EEP na biofilm szczepów *P. mirabilis* w odniesieniu do antyseptyków powszechnie stosowanych w pielęgnacji ran przewlekłych. Właściwości przeciwbiofilmowe EEP porównano z działaniem dwóch lawaseptyków stosowanych w pielęgnacji ran przewlekłych: Prontosanu® (B. Braun Melsungen AG) i Octeniseptu® (Schülke & Mayr GmbH). Substancjami aktywnymi w Prontosanie® jest betaina i poliheksanidyna, a w Octeniseptie® – chlorowoderek oktenidyny. Oba te związki należą do grupy substancji, którym przypisuje się działanie przeciwbiofilmowe [40].

W badaniach własnych wykorzystano trzy stężenia lawaseptyków, tj. stężenie dostępne w preparacie komercyjnym oraz jego 2- i 4-krotne rozcieńczenie. Wykazano, że użyte preparaty w dwóch najwyższych ocenianych stężeniach silniej ograniczają tworzenie biofilmu przez pałeczki *P. mirabilis* niż EEP, gdyż z biofilmów poddanych ich działaniu, nie izolowano żywych komórek bakteryjnych. W przypadku 24-godzinnego biofilmu poddanego działaniu lawaseptyków (Prontosan) z biofilmów *P. mirabilis* izolowano podobną liczbę komórek, jak z biofilmów traktowanych EEP. Świadczy to o porównywalnym działaniu EEP do badanych lawaseptyków, co pozwala na postawienie hipotezy o potencjalnym zastosowaniu EEP w praktyce klinicznej, tj. w pielęgnacji rany przewlekłej. Zaletą EEP w odniesieniu od lawaseptyków jest jego udowodnione działanie przeciwzapalne, co ma dodatkowo istotne znaczenie w leczeniu zakażeń o charakterze przewlekłym. Potencjalne zastosowanie EEP w leczeniu zakażeń skóry potwierdzają wyniki meta-analizy przeprowadzonej w 2021 roku przez Carvalho i wsp. [5] i opartej na 55 publikacjach. Na podstawie wyników w nich przedstawionych wyciągnięto wniosek, że flawonoidy przyspieszają gojenie się ran, wpływając na procesy angiogenezy i stres oksydacyjny.

W badaniach własnych skupiono się na wykazaniu samych właściwości przeciwbiofilmowych EEP, które są opisane w niewielkim stopniu w porównaniu do ogólnych właściwości propolisu czy jego ekstraktów. W bazie PubMed, na dzień 18.10.2022 rok, dostępnych jest 119 prac, w których tytule lub streszczeniu autorzy ujmują określenia „biofilm” i „propolis” oraz 45 prac, w których kryterium wyszukiwania stanowią wyrazy „antibiofilm” i „propolis”.

#### 4.3.4. Podsumowanie wyników i ich potencjalne wykorzystanie

Przeprowadzone przeze mnie badania pozwoliły wykazać, że pałeczki rodzaju *Proteus* intensywnie tworzą biofilm. Ma to istotne znaczenie w zrozumieniu patogenezy zakażeń z udziałem tych bakterii i w podejmowaniu racjonalnych decyzji terapeutycznych. Leczenie zakażeń, w których czynnikiem etiologicznym jest *Proteus* spp. musi koncentrować się na eradykacji nie tylko form planktonicznych komórek bakteryjnych, ale przede wszystkim na ograniczaniu tworzenia przez te bakterie struktury biofilmu.

W swoich badaniach wykazałam, że stosowanie antybiotyków z różnych grup chemicznych (cefalosporyn III generacji, fluorochinolonów) może być skuteczne w hamowaniu tworzenia biofilmu *Proteus* spp. w zależności od stopnia jego dojrzałości. Ciprofloksacyna wykazuje większą aktywność niż ceftazydym wobec biofilmu dojrzałego. Uzyskane wyniki są istotne z klinicznego punktu widzenia, gdyż mogą stanowić wskazówkę przy doborze antybiotykoterapii w zależności od tego, czy mają działać profilaktycznie, hamując tworzenie biofilmu, czy leczniczo – eradykując biofilm już utworzony. Przy ryzyku rozwoju CAUTI z obecnością biofilmu u pacjentów, u których implementacja cewnika odbyła się w ciągu kilku ostatnich dni i, którzy ujawniają objawy zakażenia, należałoby rozważyć w leczeniu szpitalnym cefalosporynę III generacji, natomiast u pacjentów z cewnikiem obecnym dłużej w drogach moczowych – ciprofloksacynę. W obu z tych sugerowanych przypadków optymalnym rozwiązaniem jest wymiana cewnika na nowy. Pomimo tego, komórki przetrwałe biofilmu są w stanie odnowić biofilm również na powierzchni sterylnej, nowo założonego cewnika. Wymiana cewnika do pęcherza moczowego jest ponadto zabiegiem inwazyjnym, który może powodować podrażnienie lub uszkodzenie komórek nabłonka dróg moczowych. Z tego powodu częsta wymiana cewników do pęcherza moczowego u pacjentów wymagających długoterminowego cewnikowania dróg moczowych nie jest praktykowana. Zastosowanie cefalosporyny III generacji lub fluorochinolonów w leczeniu zakażeń u pacjentów ze stwierdzonym nawracającym CAUTI o etiologii *P. mirabilis* może stanowić alternatywę dla wymiany cewnika na nowy, zmniejszając częstotliwość implantacji nowych cewników. Zastosowanie ciprofloksacyny jest zasadne również w przypadku ZUM wywołanych przez *P. vulgaris*.

Porównując działanie przeciwbiofilmowe fluorochinolonów wobec biofilmu tworzonych przez szczepy *P. mirabilis* izolowane z moczu wykazałam, że norfloksacyna jest skuteczniejsza w eradykacji biofilmu od ciprofloksacyny. Jest to chemioterapeutyk, który osiąga wysokie stężenia w układzie moczowym, co w połączeniu z jego aktywnością przeciwbiofilmową stwierdzoną w niniejszych badaniach, sugeruje jego skuteczne zastosowanie w leczeniu CAUTI o etiologii *P. mirabilis*. Spośród badanych przeze mnie aminoglikozydów (gentamicyna, amikacyna), bardziej skuteczna wobec biofilmu *P. mirabilis* jest amikacyna. Jest to antybiotyk, który można stosować w monoterapii ZUM ze względu na jego metabolizm nerkowy, ale może być stosowany również w połączeniu z lekami

przeciwdrobnoustrojowymi hamującymi syntezę ściany komórkowej bakterii, co skutkuje działaniem synergistycznym. Zastosowanie amikacyny może stanowić również skuteczną opcję terapeutyczną w leczeniu CAUTI *P. mirabilis*.

Wyniki moich badań wskazują na brak skuteczności witaminy C w połączeniu z aminoglikozydami lub fluorochinolonami w eradykacji biofilmu tworzonego przez pałeczki *P. mirabilis*. Połączenie tych substancji może mieć efekt odwrotny od zamierzonego i hamować aktywność przeciwbiofilmową leków przeciwbakteryjnych. Kwas askorbinowy również nie hamuje tworzenia biofilmu przez *P. mirabilis*. Witamina C nie powinna więc być polecana w profilaktyce nawracających ZUM o etiologii wymienionych pałeczek, nawet pomimo własności tej witaminy do zmian pH w układzie moczowym.

W przypadku pacjentów z przewlekłym zakażeniem rany nie ma skutecznej formy trwałej eradykacji biofilmu. Stosuje się metody fizyczne, jak chirurgiczne oczyszczanie ran, laseroterapię, fototerapię, metody biologiczne (larwoterapię z wykorzystaniem *Lucilia sericata*, *Lucilia cuprina* lub fagoterapię) i metody chemiczne opierające się na zastosowaniu lawaseptyków. Niewłaściwie lub nieskutecznie leczone zakażenie rany przewlekłej może prowadzić do amputacji i/lub rozwoju postaci uogólnionej zakażenia. W wielu przypadkach antybiotykoterapia jest konieczna, aby ograniczyć ryzyko powikłań. Lewofloksacyna wydaje się zatem być dobrą opcją leczenia zakażonych ran przewlekłych, jeśli stan kliniczny pacjenta wymaga włączenia antybiotykoterapii ogólnoustrojowej.

W leczeniu miejscowym zakażeń skóry i tkanki podskórnej o etiologii *P. mirabilis* mogą mieć zastosowanie miód Manuka oraz EEP, które w odpowiednich stężeniach hamują tworzenie biofilmu przez bakterie tego gatunku. Skuteczność EEP w ograniczeniu tworzenia biofilmu zależy od składników propolisu i jest niezależna od obecności alkoholu stanowiącego jego rozpuszczalnik. Moje badania wykazały, że miód Manuka i EEP mają porównywalne działanie przeciwbiofilmowe do niektórych lawaseptyków wykorzystywanych w pielęgnacji ran przewlekłych. Wydają się więc dobrą opcją terapeutyczną w profilaktyce zakażeń skóry i tkanki podskórnej o etiologii *P. mirabilis* u pacjentów, u których występują czynniki ryzyka rozwinięcia zakażenia o charakterze przewlekłym.

Na temat biofilmu wytworzonego przez *Proteus* spp. jest jeszcze wiele niewiadomych. Coraz częściej udowadnia się patomechanizm związany z biofilmem w licznych jednostkach i zespołach chorobowych, ale nadal jest zbyt mało informacji na temat skutecznych form ograniczania jego powstawania i zwalczania, gdy już jest utworzony. Z tego powodu znaczenie badań dotyczących biofilmu jest niezwykle istotne i wymagają one kontynuacji, szczególnie z uwzględnieniem badań klinicznych.

#### 4.3.5. Bibliografia

1. Abad L, Josse J, Tasse J, Lustig S, Ferry T, Diot A, Laurent F, Valour F (2020): Antibiofilm and intraosteoblastic activities of rifamycins against *Staphylococcus aureus*: promising *in vitro* profile of rifabutin. *J Antimicrob Chemother* 1; 75 (6): 1466-1473, doi: [10.1093/jac/dkaa061](https://doi.org/10.1093/jac/dkaa061)
2. Allison K, Brynildsen M, Collins J (2011): Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature* 473: 216 – 20, doi: [10.1038/nature10069](https://doi.org/10.1038/nature10069)
3. Antunes-Ricardo M, Gutiérrez-Urbe J, Serna-Saldívar SO (2015): Anti-inflammatory glycosylated flavonoids as therapeutic agents for treatment of diabetes-impaired wounds. *Curr Top Med Chem* 15 (23): 2456-63, doi: [10.2174/1568026615666150619141702](https://doi.org/10.2174/1568026615666150619141702)
4. Armbruster ChE, Mobley HL (2012): Merning mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. *Nature Rev Microbiol* 10: 743-754, doi: [10.1038/nrmicro2890](https://doi.org/10.1038/nrmicro2890)
5. Carvalho MTB, Araújo-Filho HG, Barreto AS, Quintans-Júnior LJ, Quintans JSS, Barreto RSS (2021): Wound healing properties of flavonoids: a systematic review highlighting the mechanisms of action. *Phytomedicine* 90, 153636, doi: [10.1016/j.phymed.2021.153636](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153636)
6. Crouzet M, Le Senechal C, Brözel VS, et al. (2014): Exploring early steps in biofilm formation: set-up of an experimental system for molecular studies. *BMC Microbiol* 14: 253, doi:[10.1186/s12866-014-0253-z](https://doi.org/10.1186/s12866-014-0253-z)
7. Del Pozo JL (2017): Biofilm-related disease. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 16: 51-65, doi: [10.1080/14787210.2018.1417036](https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1417036),
8. Donlan RM (2002): Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 8: 881-90, doi: [10.3201/eid0809.020063](https://doi.org/10.3201/eid0809.020063)
9. Eteraf-Oskouei T, Najafi M (2013): Traditional and modern uses of natural honey in human diseases: a review. *Iran J Basic Med Sci* 16 (6): 731-742,
10. Flemming HC, Wingender J (2010): The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8: 623–633, <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
11. Grudlewska-Buda K, Wiktorczyk-Kapischke N, Budzyńska A, Kwiecińska-Piróg J, Przekwas J, Kijewska A, Sabiniarz D, Gospodarek-Komkowska E, Skowron K (2022): The variable nature of vitamin C – does it help when dealing with *Coronavirus*? *Antioxidants (Basel)* 24, 11 (7): 1247. Doi: [10.3390/antiox11071247](https://doi.org/10.3390/antiox11071247)
12. Harshey RM, Matsuyama T (1994): Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium: surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells. *Proc Natl Acad Sci* 91: 8631-8635, doi: [10.1073/pnas.91.18.8631](https://doi.org/10.1073/pnas.91.18.8631)
13. Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, Hussain T, Ali M, Rafiq M, Kamil MA (2017): Bacterial biofilm and associated infections. *J Chin Med Assoc.* 81 (1): 7-11, doi: [10.1016/j.jcma.2017.07.012](https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012)
14. Janda JM, Abbott SL, Khashe S, Probert W (2001): Biochemical identification and characterization of DNA groups within the *Proteus vulgaris* complex. *J Clin Microbiol* 39 (4): 1231-1234, doi: [10.1128/JCM.39.4.1231-1234.2001](https://doi.org/10.1128/JCM.39.4.1231-1234.2001)
15. Johnston M, McBride M, Dahiya D, Owusu-Apenten R, Nigam PS (2018): Antibacterial activity of Manuka honey and its components: an overview. *AIMS Microbiol* 4 (4): 655-664, doi: [10.3934/microbiol.2018.4.655](https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.655)
16. Karygianni L, Ren Z, Koo H, Thurnheer T (2020) Biofilm matrixome: extracellular components in structured microbial communities. *Trends Microbiol* 28: Pages 668-681,
17. Kassinger SJ, van Hoek ML (2020): Biofilm architecture: an emerging synthetic biology target. *Synth Sys Biotech*, 5: 1-10,
18. Kohler-Ockmore J, Feneley RC (1996): Long-term catheterization of the bladder: prevalence and morbidity. *Br J Urol* 77: 347 – 51, doi: [10.1046/j.1464-410x.1996.09074.x](https://doi.org/10.1046/j.1464-410x.1996.09074.x)
19. Kwiecińska-Piróg J, Bogiel T, Skowron K, Więckowska E, Gospodarek E (2014): *Proteus mirabilis* biofilm – qualitative and quantitative colorimetric methods-based evaluation. *Braz J Microbiol* 45: 1415-21, doi: [10.1590/s1517-83822014000400037](https://doi.org/10.1590/s1517-83822014000400037) (P7)

20. Laumen, Jolein GE, Van Dijck Ch, Manoharan-Basil SS., Abdellati S, De Baetselier I, Cuylaerts V, De Block T, Van den Bossche D, Xavier BB, Malhotra-Kumar S, Kenyon Ch (2021): Sub-inhibitory concentrations of chlorhexidine induce resistance to chlorhexidine and decrease antibiotic susceptibility in *Neisseria gonorrhoeae*. *Front Microbiol* 12: 776909, doi: [10.3389/fmicb.2021.776909](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.776909)
21. Lewis K (2005): Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochem (Mosc)* 70 (2): 267-74, doi: [10.1007/s10541-005-0111-6](https://doi.org/10.1007/s10541-005-0111-6)
22. Li Y, Xiao P, Wang Y, Hao Y (2020): Mechanisms and control measures of mature biofilm resistance to antimicrobial agents in the clinical context. *ACS Omega* 5 (36): 22684-22690, doi: [10.1021/acsomega.0c02294](https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02294)
23. López E, Blázquez J (2009): Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on intrachromosomal homologous recombination in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 3411-3415, doi: [10.1128/AAC.00358-09](https://doi.org/10.1128/AAC.00358-09)
24. Loubet P, Ranfaing J, Dinh A, et al. (2020): Alternative therapeutic options to antibiotics for the treatment of urinary tract infections. *Front Microbiol* 11: 1509, doi: [10.3389/fmicb.2020.01509](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01509)
25. Luo Xuan, Dong Yating, Gu Chen, Zhang Xueli, Ma Haile (2021): Processing technologies for bee products: an overview of recent developments and perspectives. *Front Nutr* 8: doi: [10.3389/fnut.2021.727181](https://doi.org/10.3389/fnut.2021.727181)
26. Majkut M, Kwiecińska-Piróg J, Wszelaczyńska E, Pobereźny J, Gospodarek-Komkowska E, Wojtacki K, Barczak T (2021): Antimicrobial activity of heat-treated Polish honeys. *Food Chem* 1, 43: 128561, doi: [10.1016/j.foodchem.2020.128561](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128561) (P22)
27. Martinengo L, Olsson M, Bajpai R, Soljak M, Upton Z, Schmidtchen A, Car J, Jarbrink K (2018): Prevalence of chronic wounds in the general population: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Ann Epidemiol* 29: 8-15, doi: [10.1016/j.annepidem.2018.10.005](https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2018.10.005)
28. Mathur S, Suller MT, Stickler DJ et al. (2006): Factors affecting crystal precipitation from urine in individuals with long-term urinary catheters colonized with urease-positive bacterial species. *Urol Res* 34: 173-177, doi: [10.1007/s00240-006-0036-6](https://doi.org/10.1007/s00240-006-0036-6)
29. Mobley HTL (1996): Virulence of *Proteus mirabilis*. In: Mobley HTL, Warren JW, eds. *Urinary tract infections: molecular pathogenesis and clinical management*. Washington DC: ASM Press: 245-270
30. Morgenstein RM, Szostek B, Rather PN (2010): Regulation of gene expression during swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. *FEMS Microbiology Rev* 34: 753-763, doi: [10.1111/j.1574-6976.2010.00229.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00229.x)
31. Munson E, Carroll KC (2019): An update on the novel genera and revised taxonomic status of bacterial organisms described in 2016 and 2017. *J Clin Microbiol* 57 (2): e01181-18, doi: [10.1128/JCM.01181-18](https://doi.org/10.1128/JCM.01181-18)
32. N Høiby (2014): A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections. *Path Dis* 70: 205-211, <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12165>
33. Noureldin YA, da Silva A, Fahmy N, Andonian S (2017): Is it safe to prescribe ascorbic acid for urinary acidification in stone-forming patients with alkaline urine? *Turk J Urol* 43: 183 – 8, doi: [10.5152/tud.2017.02700](https://doi.org/10.5152/tud.2017.02700)
34. Osés SM, Marcos P, Azofra P, de Pablo A, Fernández-Muñoz MÁ, Sancho MT (2020): Phenolic profile, antioxidant capacities and enzymatic inhibitory activities of propolis from different geographical areas: needs for analytical harmonization. *Antioxidants (Basel)* 9 (1): 75, doi: [10.3390/antiox9010075](https://doi.org/10.3390/antiox9010075)
35. Padayatty SJ, Levine M (2016): Vitamin C: the known and the unknown and goldilocks. *Oral Dis* 22: 463-493, doi: [10.1111/odi.12446](https://doi.org/10.1111/odi.12446).
36. Paluch E, Rewak-Soroczyńska J, Jędrusik I et al. (2020): Prevention of biofilm formation by quorum quenching. *Appl Microbiol Biotechnol* 104: 1871-81, doi: [10.1007/s00253-020-10349-w](https://doi.org/10.1007/s00253-020-10349-w)
37. Penesyan A, Paulsen IT, Gillings MR, Kjelleberg S, Manefield MJ (2020): Secondary effects of antibiotics on microbial biofilms. *Front Microbiol* 2: 2109. Doi: [10.3389/fmicb.2020.02109](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02109)
38. Quan K, Hou J, Zhang Z, Ren Y, Peterson BW, Flemming H-C, Mayer Ch, Busscher HJ, van der Mei HC (2021): Water in bacterial biofilms: pores and channels, storage and transport functions. *Crit Rev Microbiol*, [10.1080/1040841X.2021.1962802](https://doi.org/10.1080/1040841X.2021.1962802)

39. Roberts ME, Stewart PS (2004): Modeling antibiotic tolerance in biofilms by accounting for nutrient limitation. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 48-52, doi:[10.1128/AAC.48.1.48-52.2004](https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.48-52.2004)
40. Różalski A, Kwil I, Torzewska A, Baranowska M, Stączek P (2002): *Proteus* bacilli: features and virulence factors. *Adv Hyg Exp Med* 61: 204-19
41. Salisbury AM, Mullin M, Chen R, Percival SL (2022): Antibiofilm efficacy of polihexanide, octenidine and sodium hypochlorite/hypochlorous acid based wound irrigation solutions against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and a multispecies biofilm. *Adv Exp Med Biol* 1369: 53-67, doi: [10.1007/5584\\_2021\\_645](https://doi.org/10.1007/5584_2021_645)
42. Schaffer JN, Pearson MM (2015): *Proteus mirabilis* and urinary tract infections. *Microbiol Spectr* 3 (5): 10.1128 doi: [10.1128/microbiolspec.UTI-0017-2013](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.UTI-0017-2013)
43. Shibata K, Fukuwatari T, Ohta M, Okamoto H, Watanabe T, Fukui T, Nishimuta M, Totani M, Kimura M, Ohishi N, Nakashima M, Watanabe F, Miyamoto E, Shigeoka S, Takeda T, Murakami M, Ihara H, Hashizume N (2005): Values of water-soluble vitamins in blood and urine of Japanese young men and women consuming a semi-purified diet based on the Japanese Dietary Reference Intakes. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 51 (5): 319-28, doi: [10.3177/jnsv.51.319](https://doi.org/10.3177/jnsv.51.319). PMID: 16392702
44. Stephens JM, Schlothauer RC, Morris BD, Yang D, Fearnley L, Greenwood DR, Loomes KM (2009): Phenolic compounds and methylglyoxal in some New Zealand Manuka and Kanuka honeys. *Food Chem* 120: 78–86, doi: [10.1016/j.foodchem.2009.09.074](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.074)
45. Stickler DJ (2014): Clinical complications of urinary catheters caused by crystalline biofilms: something needs to be done. *JIM* 6, 120-9, doi: [10.1111/joim.12220](https://doi.org/10.1111/joim.12220)
46. Tomczyk M, Tarapatskyy M, Dzugan M (2019): The influence of geographical origin on honey composition studied by Polish and Slovak honeys. *Czech J Food Sci* 37: 232 – 8, doi: [10.17221/40/2019-CJFS](https://doi.org/10.17221/40/2019-CJFS)
47. Torzewska A, Różalski A (2015): Various intensity of *Proteus mirabilis*-induced crystallization resulting from the changes in the mineral composition of urine. *ABP*, 62: 127-132, doi: [10.18388/abp.2014\\_882](https://doi.org/10.18388/abp.2014_882)
48. Ullah A, Munir S, Badshah SL, Khan N, Ghani L, Poulson BG, Emwas A-H, Jaremko M (2020): Important flavonoids and their role as a therapeutic agent. *Molecules* 25: 5243, doi: [10.3390/molecules25225243](https://doi.org/10.3390/molecules25225243)
49. Wang L, Zhang S, Keatch R, Corner G, Nabi G, Murdoch S, Davidson F, Zhao Q (2019): *In vitro* antibacterial and anti-encrustation performance of silver-polytetrafluoroethylene nanocomposite coated urinary catheters. *J Hosp Inf* 103: 55-63, doi: [10.1016/j.jhin.2019.02.012](https://doi.org/10.1016/j.jhin.2019.02.012)
50. Wasfi R, Hamed SM, Amer MA, Fahmy LI (2020): *Proteus mirabilis* biofilm: development and therapeutic strategies. *Front Cell Infect Microbiol* 10: 14, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00414>
51. White AN, Learman BS, Brauer AL, Armbruster ChE (2021): Catalase activity is critical for *Proteus mirabilis* biofilm development, EPS composition, and dissemination during catheter-associated urinary tract infection. *Infect Immun* 16, 89 (10): e0017721, doi: <https://doi.org/10.1101/2021.03.22.436542>
52. Yufang Bi, Guixue X, Chao S, Jianglin W, Longqiang L, Yuan Chen, Yueming W, Wenjing Z, Min Z, Hongyan H, Runhui L (2021): Therapeutic strategies against bacterial biofilms. *Fundamental Res* 1: 193-212, doi: [10.1016/j.fmre.2021.02.003](https://doi.org/10.1016/j.fmre.2021.02.003)
53. Zheng S, Bawazir M, Dhall A, Kim H-E, He L, Heo J and Hwang G (2021): Implication of surface properties, bacterial motility, and hydrodynamic conditions on bacterial surface sensing and their initial adhesion. *Front Bioeng Biotechnol* 9: 643722, doi: [10.3389/fbioe.2021.643722](https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.643722)
54. Zuhlendri F, Chandrasekaran K, Kowacz M, Ravalia M, Kripal K, Fearnley J, Perera CO (2021): Antiviral, antibacterial, antifungal, and antiparasitic properties of propolis: a review. *Foods* 11, 10 (6): 1360, doi: [10.3390/foods10061360](https://doi.org/10.3390/foods10061360)
55. <http://antybiotyki.edu.pl/wp-content/uploads/Rekomendacje/rekomendacje-stosowanie-ant-wybranych-zak-skory.pdf> (data wejścia: 29.08.2022)
56. <https://clsi.org/> (data wejścia: 29.08.2022)
57. <https://www.eucast.org/> (data wejścia: 29.08.2022)
58. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy> (data wejścia: 29.08.2022)

## 5. INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ ALBO ARTYSTYCZNĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI, INSTYTUCJI NAUKOWEJ LUB INSTYTUCJI KULTURY, W SZCZEGÓLNOŚCI ZAGRANICZNEJ

Kontynuacją badań przedstawionych w opisanym powyżej cyklu stanowiącym osiągnięcie naukowe, jest ocena wpływu chemioterapeutyków oraz kwasu askorbinowego i rutozydu jako antyoksydantów na zdolność hamowania tworzenia biofilmu przez pałeczki *P. mirabilis* (P34). W badaniu wykorzystano stężenia antyoksydantów, które są osiąmane w moczu po doustnej suplementacji diety ocenianymi związkami, tj. 0,4 mg/ml kwasu askorbinowego oraz 0,02 µg/ml rutozydu. Uwzględnione stężenia fluorochinolonów odpowiadały wartościom z zakresu od ¼ MIC do 4 MIC określonego dla komórek planktonicznych każdego z 15 uwzględnionych szczepów *P. mirabilis*. Metodyka badań opierała się na zaleceniach CLSI (metoda mikrorozcieńczeń w podłożu płynnym). Oceniano wpływ badanych związków indywidualnie i w połączeniach: chemioterapeutyk (norfloksacyna lub ciprofloksacyna) i jeden wybrany antyoksydant; chemioterapeutyk i obydwa antyoksydanty; dwa antyoksydanty. Wykazano, że rutozyd w połączeniu z kwasem askorbinowym istotnie statystycznie hamuje tworzenie biofilmu przez badane szczepy *P. mirabilis*. Takiego działania nie wykazano dla żadnego innego zastosowanego połączenia badanych substancji. Wyniki tych badań, które są przedstawione w publikacji P34 (Przekwas J, Gębalski J, Kwiecińska-Piróg J, Wiktorczyk-Kapischke N, Wałęcka-Zacharska E, Gospodarek-Komkowska E, Rutkowska D, Skowron K (2022): The effect of fluoroquinolones and antioxidants on biofilm formation by *Proteus mirabilis* strains. Ann Clin Microbiol Antimicrob 21: 1-10; IF 6,781, MEiN 100) sugerują potencjalne wykorzystanie połączenia rutozydu z kwasem askorbinowym w profilaktyce ZUM o etiologii *P. mirabilis*.

Oprócz badań, których wyniki przedstawiono w części II [H1-H5], prowadzę działalność naukową we współpracy z innymi uczelniami bądź instytucjami naukowymi, a koncentruje się ona przede wszystkim na ocenie działań przeciwdrobnoustrojowych, w tym przeciwbiofilmowych, związków naturalnych pochodzenia pszczelego, jonów metali i antyoksydantów oraz nowych technologii, głównie promieniowej jonizacji katalitycznej (ang. radiant catalytic ionization, RCI).

Odrębne obszary badawcze stanowi zagadnienie transmisji drobnoustrojów w środowisku szpitalnym oraz drobnoustroje przenoszone przez żywność (ang. food-born pathogens). Ostatnie dwa lata spowodowały również zainteresowanie tematem zespołu ciężkiej niewydolności oddechowej związanej z Koronawirusem-2 (ang. severe acute respiratory syndrome *Coronavirus 2*, SARS-CoV-2), w szczególności odpowiedzią immunologiczną u osób po szczepieniu.



### 5.1. Ocena właściwości przeciwdrobnoustrojowych substancji pochodzenia naturalnego, jonów metali i antyoksydantów

W ramach badań z zespołem naukowców z Zakładu Zoologii i Architektury Krajobrazu Politechniki Bydgoskiej oceniałam wpływ temperatury na aktywność przeciwdrobnoustrojową różnych miodów pochodzących z pasiek umiejscowionych w północnej Polsce. Podczas realizacji tych doświadczeń badałam wpływ czterech temperatur wobec czterech miodów, różnych pod względem składu, tj. miodu gryczanego, kwiatowego, leśnego i rzepakowego. Kontrolę stanowił miód nie poddawany obróbce cieplnej, tj. taki, którego właściwości przeciwbakteryjne zostały określone w temperaturze 22°C. W celu określenia właściwości przeciwbakteryjnych zastosowanych miodów poddawanych obróbce termicznej, oceniałam wartości MBC miodu. Grupa badaczy z Politechniki Bydgoskiej określiła stężenie witamy C, związków fenolowych i aktywność antyoksydacyjną w każdym z miodów ujętych w tej ocenie. Wykazano statystycznie istotną redukcję wartości MBC w przypadku miodów poddawanych wpływi temperatury 62°C i 82°C po 15 i 120 minutach ekspozycji oraz całkowity brak działania przeciwdrobnoustrojowego po traktowaniu miodów temperaturą 100°C. Po 15-minutowej ekspozycji miodu na obydwie oceniane temperatury notowano znaczący spadek stężenia witaminy C przy jednoczesnym wzroście zawartości polifenoli ( $\geq 27\%$ ) i aktywności antyoksydacyjnej wyrażanej siłą antyoksydacyjną redukcji żelaza (ang. ferric reducing-antioxidant power, FRAP;  $\geq 106\%$ ). To właśnie zawartość fenoli determinuje szereg właściwości prozdrowotnych [48]. Wyniki tych badań zostały przedstawione w publikacji **P22** (Majkut M, Kwiecińska-Piróg J, Wszelaczyńska E, Pobereżny J, Gospodarek-Komkowska E, Wojtacki K, Barczak T (2021): Antimicrobial activity of heat-treated Polish honeys, Food Chem 1, 343: 128561; IF 9,231 MEiN 200).

Innym kierunkiem badań była ocena właściwości przeciwbiofilmowych prototypów implantów wykorzystywanych w ortopedii, realizowana w ramach dwóch umów z Instytutem Obróbki Plastycznej w Poznaniu (aktualnie jednostka w strukturze wielodyscyplinarnej placówki naukowo-badawczej – Łukasiewicz – Poznański Instytut Technologiczny). Pierwsze badania, które wykonywałam z badaczami tej jednostki, dotyczyły oceny właściwości przeciwbiofilmowych związków stosowanych do powlekania hydroksyapatytem i nanocząsteczkami srebra tytanowych fragmentów prototypów implantów. Związki te były połączone z powierzchniami przygotowanych przez zespół z Poznania biomateriałów. Powierzchnie te były umieszczane na 24 godziny w zawiesinie badanego szczepu *Staphylococcus epidermidis* ATCC®35984™ celem utworzenia przez niego biofilmu. Po inkubacji biomateriały przemywano jałowym roztworem PBS (Graso Biotech, Poland) i barwiono solami TTC, aby uwidocznić przylegające komórki drobnoustrojów. Wykazano, że pokrycie fragmentów prototypów implantów hydroksyapatytem i nanocząsteczkami srebra ogranicza tworzenie biofilmu przez badany szczep w porównaniu do powierzchni biomateriału bez tej powłoki. Wyniki badań zostały przedstawione

w pracy **P9** (Sulej-Chojnacka J, Kloskowski T, Borowski J, Ignatev M, Bajek A, Wiśniewska-Weinert H, **Kwiecińska-Piróg J**, Drewa T (2016): Prototype coatings of titanium alloy samples with silver nanoparticles and their biological characterization, *in vitro* study, *J Biomater Tissue Eng* 6: 463-472 (IF 1,383, MEiN 15).

Kontynuacją współpracy z Instytutem Obróbki Plastycznej w Poznaniu była ocena tworzenia biofilmu przez *S. epidermidis* ATCC®35984™ i *P. aeruginosa* ATCC®700829™ na powierzchni materiałów stosowanych do wytwarzania implantów kostnych, tj. stali i tytanu pokrytych hydroksyapatytem lub hydroksyapatytem i jonami miedzi. Wyniki tych badań zostały zawarte w raporcie **R3**, które wykonywałam jako członek Stowarzyszenia „Rozwój Mikrobiologii”. W badaniach tych oceniałam biofilm utworzony na jałowych fragmentach biomateriałów. Metodą posiewów ilościowych zawiesin uzyskanych z biofilmów, która jest jedną z metod uznawanych za „złoty standard” w ocenie wpływu różnych związków na biofilm drobnoustrojów, wykazano, że obecność jonów miedzi związanych z hydroksyapatytem ogranicza tworzenie biofilmu przez badane szczepy w porównaniu do obydwu tych materiałów z naniesioną wyłącznie powłoką hydroksyapatytową. Wyniki tych doświadczeń stanowią podstawę dalszych badań, na etapie przedklinicznym i klinicznym, w zakresie wykorzystania ocenianych biomateriałów z jonami miedzi w ortopedii.

## 5.2. Ocena działania przeciwdrobnoustrojowego nowych technologii

W ramach współpracy z innymi jednostkami naukowymi, byłam członkiem zespołu badawczego, który realizował badania dla Wojskowej Akademii Technicznej im. Jarosława Dąbrowskiego w Warszawie. Stanowiły one część projektu Narodowego Centrum Badań i Rozwoju numer 50/2015, pt. „Assessment of the efficiency of the thermocatalytic device in the aspect of air purification from biological toxic substances”. Przedmiotem tego opracowania była weryfikacja efektywności oczyszczania powietrza z biologicznych substancji toksycznych z użyciem dostarczonego urządzenia doświadczalnego (po korektach konstrukcyjnych/materiałowych) oraz określenie optymalnych warunków jego pracy. Materiał do badań stanowiły szczepy wzorcowe bakterii pochodzących z kolekcji ATCC®: *Bacillus thuringiensis* ATCC® 33679™ (formy wegetatywne i spory) i *Enterococcus faecium* ATCC® 51559™ oraz grzybów strzępkowych, *Aspergillus brasiliensis* ATCC® 16404™. Ocenę czystości mikrobiologicznej powietrza przeprowadzano w oparciu o metodę zderzeniową z wykorzystaniem podłoża Columbia Agar z dodatkiem 5% krwi baraniej (*bioMérieux*) dla *B. thuringiensis* i *E. faecium* oraz agaru Sabourauda (*bioMérieux*) dla *A. brasiliensis*. W wyniku niemal półrocznych badań wykazano, że urządzenie termokatalityczne istotnie (przeważnie ponad 99% eliminacji) ogranicza poziom zanieczyszczenia mikrobiologicznego powietrza szczepami badanych gatunków drobnoustrojów. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w skuteczności przeciwdrobnoustrojowej urządzenia

termokatalitycznego w zależności od temperatury pracy i szybkości przepływu powietrza. Wyniki badań zostały przedstawione w dwóch raportach, pt. „Określenie warunków pracy (temperatura pracy, natężenie przepływu powietrza, stężenie cząstek biologicznych) zapewniających maksymalną efektywność oczyszczania powietrza z toksycznych czynników biologicznych z użyciem przedprototypu urządzenia doświadczalnego” (R4) i „Weryfikacja efektywności oczyszczania powietrza z toksycznych czynników biologicznych z użyciem ostatecznej wersji urządzenia doświadczalnego (po korektach konstrukcyjnych/materiałowych). Określenie optymalnych warunków pracy urządzenia” (R5).

Innym obszarem moich badań są metody wpływające na ograniczenie tworzenia biofilmu przez drobnoustroje z zastosowaniem metod fizycznych. Jedną z nich, która wydaje się mieć potencjał przeciwbiofilmowy, jest technologia RCI. Pomimo tego, że technologia RCI istnieje od drugiej połowy ubiegłego wieku, jej działanie przeciwdrobnoustrojowe jest poznane w niewielkim stopniu. RCI polega na emisji reaktywnych form tlenu, które generują uszkodzenia oksydacyjne, przede wszystkim w materiale genetycznym drobnoustrojów. W komórkach bakteryjnych działanie RCI skutkuje, m.in., oksydacją koenzymu A czy oksydacją fosfolipidów błon komórkowych.

Zakres działania przeciwdrobnoustrojowego RCI jest szeroki. W badaniach, w których uczestniczyłam jako członek zespołu badawczego, wykazano, że RCI skutecznie zmniejsza na wstępie skontaminowanych powierzchniach i w powietrzu liczbę re-izolowanych drobnoustrojów, reprezentujących różne grupy taksonomiczne (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *E. coli*, *Salmonella* Enteritidis, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* i *Penicillium chrysogenum*). Wyniki tych badań przedstawiono w publikacji P11 (Skowron K, Grudlewska K, Kwiecińska-Piróg J, Gryń G, Śrutek M, Gospodarek-Komkowska E (2018): Efficacy of radiant catalytic ionization to reduce bacterial populations in air and on different surfaces. *Sci Total Environ*, 610-611: 111-120; IF 5,589, MEiN: 40).

RCI jest technologią, która ma potencjał do wprowadzenia w przemyśle przetwórstwa żywności. Na etapie przedwdrożeńowym wymaga badań, które pozwolą na określenie czynników wpływających na skuteczność jej działania. Jako członek zespołu brałam udział w jednym z takich badań, których celem było określenie wpływu na skuteczność działania przeciwdrobnoustrojowego RCI, m.in.: czasu ekspozycji skontaminowanych powierzchni, temperatury pracy urządzenia, odległości powierzchni od źródła promieniowania oraz obciążenia organicznego badanych powierzchni (P20; Skowron K, Wałęcka-Zacharska E, Grudlewska K, Kwiecińska-Piróg J, Wiktorczyk N, Kowalska M, Paluszak Z, Kosek-Paszkowska K, Brożek K, Korkus J, Gospodarek-Komkowska E (2020): Effect of selected environmental factors on the microbicidal effectiveness of radiant catalytic ionization. *Front Microbiol* 10: 1-13; IF 5,640, MEiN 100).

Kontynuacją tych badań było wykazanie skuteczności RCI w eradykacji szczepów *Salmonella* trzech serowarów (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurim* i *S. Virchow*) naniesionych na powierzchnie skorup jaj

kurzych. Skuteczność ocenianej technologii była porównywana do techniki ozonowania, która jest jedną z metod stosowanych do dezynfekcji jaj kurzych, w szczególności jaj lęgowych (**P30**; Grudlewska-Buda K, Wiktorczyk-Kapischke N, Wałęcka-Zacharska E, **Kwiecińska-Piróg J**, Gryń G, Skowron KJ., Korkus J, Gospodarek-Komkowska E, Bystroń J, Budzyńska A, Kruszewski S, Paluszak Z, Andrzejewska M, Wilk M, Skowron K (2022): Effect of radiant catalytic ionization and ozonation on *Salmonella* spp. on eggshells. *Foods* 11: 1-11; 2452. IF 5,561; MEiN 100).

Działanie RCI wobec adhezji oraz biofilmu drobnoustrojów zaliczanych do patogenów związanych z żywnością było oceniane w badaniach, w których uczestniczyłam wraz z naukowcami z Politechniki Bydgoskiej oraz Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. W pracy wykorzystano szczepy z gatunków/serowarów: *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis* i *Campylobacter jejuni*. Biofilm tworzono na powierzchni szkła i poddawano działaniu RCI. Kontrolę stanowił biofilm nie poddawany działaniu czynników zewnętrznych. Dla oceny skuteczności RCI wobec komórek tworzących biofilm, wykorzystano współczynnik redukcji, który wyliczono jako iloraz [różnicy liczby j.t.k. uzyskanych z powierzchni szkła na początku adhezji/biofilm (I) i j.t.k. na końcu eksperymentu (B)] do j.t.k. (I).

RCI, które oddziaływało na biofilm badanych gatunków bakterii przez 24 godziny, w znamieny statystycznie sposób ograniczyło liczbę komórek tworzących biofilm. Współczynnik redukcji adhezji pod wpływem RCI wyniósł, w zależności od rodzaju bakterii, 0,611, 0,636 i 0,734, odpowiednio dla *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes* i *C. jejuni*. Współczynniki redukcji 24-godzinnego biofilmu były niższe i wyniosły, odpowiednio: 0,262, 0,329 i 0,240 (**P21**; Skowron K, Skowron KJ, Bauza-Kaszewska J, Wałęcka-Zacharska E, **Kwiecińska-Piróg J**, Grudlewska-Buda N, Wiktorczyk N, Gospodarek-Komkowska E (2020): The antimicrobial effect of radiant catalytic ionization on the bacterial attachment and biofilm formation by selected foodborne pathogens under refrigeration conditions. *Appl Sci-Basel* 10: 1364, 1-15; IF 2,679, MEiN 100).

Poszerzeniem badań prowadzonych w temacie RCI, jest współpraca z badaczami ze Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego (SGGW) w Warszawie. Celem tych badań było określenie możliwości praktycznego zastosowania badanej technologii. Obejmują one, oprócz oceny wpływu na liczebność drobnoustrojów w badanych pomieszczeniach w porównaniu do pomieszczeń bez działającej technologii RCI, również ocenę bezpieczeństwa stosowania RCI wobec żywych organizmów eukariotycznych, których modelowym przykładem są myszy laboratoryjne. W modelu badawczym zaprojektowano dwa pomieszczenia o takiej samej kubaturze i identycznym wyposażeniu wnętrza (klatki dla zwierząt), tak samo rozmieszczonym. W jednym z pomieszczeń umieszczono urządzenie emitujące RCI, a drugie pomieszczenie stanowiło kontrolę odniesienia. Efekt działania RCI był oceniany przed uruchomieniem RCI i w 7-iej dobie działania technologii. Próbkę do badań mikrobiologicznych pobierane były ze wszystkich dostępnych powierzchni (ściana, podłoga, klatki) oraz z powietrza. Moim zadaniem było zaplanowanie schematu pobierania próbek do badań mikrobiologicznych, interpretacja

uzyskanych wyników posiewów i ich analiza. Stężenia substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym jako parament prooksydacyjny w tkankach myszy, czy stężenie amoniaku, pyłu oraz parametry morfologii krwi obwodowej myszy były oceniane przez badaczy z SGGW w Warszawie. Wyniki badań wskazują, że przy jednoczesnym braku wzrostu obciążenia mikrobiologicznego pomieszczenia z umieszczonym wewnątrz urządzeniem RCI w porównaniu do pomieszczenia odniesienia po 7 dobach działania zastosowanej technologii notuje się utrzymanie parametrów prooksydacyjnych w tkankach myszy oraz wartości parametrów morfologii krwi obwodowej w dopuszczalnych granicach określanych dla zdrowych osobników. Stwierdzono także zmniejszenie stężenia amoniaku i zapylenia w pomieszczeniu, w którym umieszczono RCI w porównaniu do pomieszczenia kontrolnego. Wyniki badań zostały przedstawione w dwóch publikacjach z moim udziałem (**P31**: Niemiec T, Skowron K, Świderek W, **Kwiecińska-Piróg J**, Gryń G, Fiszdon K, Łozicki A, Zglińska K, Kosieradzka I, Koczoń P (2022): Radiant catalytic ionization improves the microbiological status of rodent facilities without affecting the prooxidative status of mice. *Lab Anim.* E-ISSN: 1758-1117; IF 2,908, MEiN 100 oraz **P33**: Niemiec T, Skowron K, Świderek W, **Kwiecińska-Piróg J**, Gryń G, Wójcik-Trechcińska U, Gajewska M, Zglińska K, Łozicki A, Koczoń P (2022): Effect of radiant catalytic ionization on environmental conditions in rodent rooms and the haematological status of mice *BMC Vet Res.* 3, 18, 1: 298; IF 1,777, MEiN 40).

Obecnie, w ramach kontynuacji projektu, zakończony został etap badań wpływu RCI na stopień obciążenia mikrobiologicznego ww. pomieszczeń zwierzętarni SGGW, w których technologia RCI była włączona przez cztery miesiące. Wyniki zostały zawarte w raporcie, pt. „Ocena wpływu technologii promieniowej jonizacji katalitycznej na czystość mikrobiologiczną powietrza, wybranych powierzchni oraz ściółki w zwierzętarni” (**R14**).

Ponadto skuteczność RCI była oceniana wobec patogenów alarmowych stanowiących istotne zagrożenie w środowisku szpitalnym. W badaniach, które wykonywano na zlecenie podmiotu gospodarczego (**R9**), wykazano, że RCI zmniejsza liczebność pałeczek *Klebsiella pneumoniae* ze stwierdzoną fenotypową ekspresją karbapenemazy klasy B według klasyfikacji Ambler (ang. New Delhi metalobetalactamases, NDM) na powierzchniach wykonanych z bawełny, frotte i PCV, z których mogą być wykonane materiały, przedmioty czy meble w środowisku chorego w szpitalu (**P18**: Skowron K, Wiktorczyk N, **Kwiecińska-Piróg J**, Sękowska A, Wałęcka-Zacharska E, Gospodarek-Komkowska E (2019): Elimination of *Klebsiella pneumoniae* NDM from the air and selected surfaces in hospital using radiant catalytic ionization. *Lett Appl Microbiol* 69: 333-338; IF 2,173, MEiN 70).

### 5.3. Patogeny przenoszone z żywnością

Patogeny przenoszone z żywnością, w szczególności z żywnością przetworzoną, gotową do konsumpcji (ang. ready to eat, RTE) stanowią obecnie duże zagrożenie dla zdrowia i życia ludzi. Do grupy tej zalicza

się przede wszystkim: *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. i *C. jejuni*. Mogą one wywoływać zakażenia ograniczone do układu pokarmowego, ale również przechodzić w postaci uogólnione. Z tego względu ważne jest poszukiwanie metod ograniczenia liczebności tych drobnoustrojów na początku procesu przetwarzania żywności i określenie dróg transmisji wraz z potencjalnymi sposobami ich przerwania.

W celu realizacji tego zadania, prowadziłam badania z naukowcami, m.in., z Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, w zakresie określenia wirulencji, dróg rozprzestrzeniania się w środowisku i sposobów eliminacji ze środowiska Gram-dodatnich pałeczek z gatunku *L. monocytogenes*. Bakterie te stanowią istotny problem w przemyśle spożywczym, gdyż charakteryzuje je zdolność przeżycia i namnażania w niskich temperaturach, jakie z reguły są wymagane w zakładach przetwórstwa rybnego (P13: Skowron K, Kwiecińska-Piróg J, Grudlewska K, Świeca A, Paluszak Z, Bauza-Kaszewska J, Wałęcka-Zacharska E, Gospodarek-Komkowska E (2018): The occurrence, transmission, virulence and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* in fish processing plant. *Int J Food Microbiol* 282: 71-83; IF 4,006, MEiN 40). Konsekwencją tego jest, m.in., łatwość ich utrzymywania się, jak i rozprzestrzenianiu się w środowisku i kontaminacji żywności na każdym etapie jej przetwarzania, transportu i przechowywania, a z tym wiąże się wzrost ryzyka wystąpienia listeriozy u ludzi spożywających tę żywność. Jest to zakażenie, które może dawać różne objawy kliniczne, od skąpoobjawowych do stanu bezpośrednio zagrażającego życiu, gdyż czynniki wirulencji tego gatunku pozwalają *L. monocytogenes* przełamać wszystkie naturalne bariery obronne w organizmie człowieka. Ponadto bakterie te mają niezwykle zdolności adaptacyjne do różnych warunków środowiskowych, w tym udowodnione zdolności tworzenia biofilmu, co dodatkowo zwiększa ich potencjał chorobotwórczy.

Szczepy izolowane ze środowiska (z żywności) i od ludzi różnią się, np. potencjałem do tworzenia biofilmu, co wykazano w badaniach prowadzonych z naukowcami z Politechniki Bydgoskiej i Instytutem Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Państwowego Instytutu Badawczego, Oddział w Bydgoszczy (P15: Skowron K, Wałęcka-Zacharska E, Grudlewska K, Wiktorczyk N, Kaczmarek A, Gryń G, Kwiecińska-Piróg J, Juszcuk K, Paluszak Z, Kosek-Paszkowska K, Gospodarek-Komkowska E (2019): Characteristics of *Listeria monocytogenes* strains isolated from milk and humans and the possibility of milk-borne strains transmission. *Pol J Microb* 68: 353-369; IF 0,897, MEiN 40). Sugeruje to konieczność prowadzenia badań dotyczących pałeczek *L. monocytogenes* w sposób wielodyscyplinarny, gdyż w listeriozie, zarówno środowisko, jak i skażona tymi bakteriami żywność stanowią istotne źródło zakażeń u człowieka i nie można oceniać cech bakterii izolowanych wyłącznie z przypadków zakażeń.

Wyniki oceny właściwości biofilmu tworzonego przez pałeczki *L. monocytogenes* zostały przedstawione w pracy P16 (Skowron K, Wiktorczyk N, Grudlewska K, Kwiecińska-Piróg J, Wałęcka-Zacharska E, Paluszak Z, Gospodarek-Komkowska E (2019): Drug-susceptibility, biofilm-forming ability

and biofilm survival on stainless steel of *Listeria* spp. strains isolated from cheese. Int J Food Microbiol 296: 75-82; IF 4,187, MEiN 100). Biofilm *L. monocytogenes* był tworzony na fragmentach stali. Została ona wybrana do badań, gdyż jest materiałem, z którego wykonywane są elementy wyposażenia zakładów przetwórstwa żywności, mogącego stanowić rezerwuuar pałeczek tego gatunku i możliwe źródło skażenia żywności. Biofilm oceniano dwiema metodami, tj. posiewu ilościowego zawiesiny uzyskanej po sonikacji fragmentów stali z utworzonym na jej powierzchni biofilmem, oraz oceny suchej masy biofilmu. Wykazano, że wszystkie szczepy *L. monocytogenes* ujęte w badaniu miały zdolność tworzenia biofilmu na badanej powierzchni. W oparciu o równanie regresji teoretycznej, obliczono teoretyczny czas przeżycia *L. monocytogenes* w postaci biofilmu na stali. Wahał się on od 13,85 do 124,41 dni, co było zależne w dużej mierze od temperatury namnażania szczepów – najdłuższy czas uzyskano dla temperatury 4°C (47,58 – 124,42 dni), a najkrótszy – dla temperatury 37°C (13,85 – 32,50 dni). Wyniki te wskazują na istotne zagrożenie dla skażenia żywności, które może być konsekwencją zdolności tych bakterii do tworzenia biofilmu i długotrwałego przeżycia w środowisku produkcyjnym.

Zdolność do tworzenia biofilmu przez inny rodzaj patogenów przenoszonych z żywnością, tj. przez szczepy różnych serowarów *Salmonella* spp. (*S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium* i *S. Mbandaka*) została wykazana w kolejnych badaniach prowadzonych z moim udziałem (P25: Białucha A, Gospodarek-Komkowska E, Kwiecińska-Piróg J, Skowron K (2021): Influence of selected factors on biofilm formation by *Salmonella enterica* strains. Microorganisms 9: 43, 1-11; IF 4,926, MEiN 40). Na ograniczenie tworzenia biofilmu przez pałeczki *Salmonella* spp. wpływają sole żółci obecne w środowisku wzrostu, co sugeruje istnienie naturalnego mechanizmu w organizmie człowieka, który chroni drogi żółciowe przed długotrwałą kolonizacją pochorobową przez pałeczki tego rodzaju.

Jedną z możliwości ograniczenia ryzyka utrzymywania się bakterii w środowisku jest wprowadzenie specjalnych opakowań do żywności, które, oprócz funkcji zabezpieczenia żywności przed uszkodzeniami mechanicznymi, pełniłyby rolę swoistych „inhibitorów” biofilmu. Jedno z badań, w których uczestniczyłam, dotyczyło potencjalnego zastosowania produktów pochodzenia pszczelego jako składników powlekających powierzchnie polipropylenu wykorzystywane jako opakowania żywności. W badaniach zastosowano dwa produkty pszczele, tj. propolis i pyłek pszczeli, z których uzyskano alkoholowe roztwory, odpowiednio: EEP i etanolowy ekstrakt pyłku pszczelego (ang. ethanolic extract of bee pollen, EEBP) o stężeniach 40%. Całkowita zawartość fenoli i analiza fitochemiczna propolisu i pyłku pszczelego została wykonana we współpracy z Katedrą Botaniki Farmaceutycznej i Farmakognozji CM UMK. Fragmenty polipropylenu z powłoką chitosanu, EEP i EEBP były przygotowywane przez pracowników Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Państwowego Instytutu Badawczego, Oddział w Bydgoszczy. W tak przygotowane fragmenty zostały zapakowane skrawki łososia inokulowane zawiesiną *L. monocytogenes*. Jako model badawczy wybrano filet łososia (łac. *Salmo salar*), gdyż ta ryba jest częstym rezerwuarem pałeczek *L. monocytogenes*. Ocena liczby re-

izolowanych komórek *L. monocytogenes* była przeprowadzana w kilku wariantach czasowych, od jednej godziny do 15 dni. W badaniach tych wykazano, że użycie 20% EEP wraz z 2% chitosanem do impregnacji polipropylenowych opakowań może nie tylko ograniczyć namnażanie się pałeczek *L. monocytogenes*, ale w istotny sposób zmniejszyć skażenie żywności badanymi szczepami (P14: Skowron K, Kwiecińska-Piróg J, Grudlewska K, Gryń K, Wiktorczyk N, Balcerek M, Załuski D, Wałęcka-Zacharska E, Kruszewski S, Gospodarek-Komkowska E (2019): Antilisterial activity of polypropylene film coated with chitosan with propolis and/or bee pollen in food models. *BioMed Res Int*: 1-12; IF 2,276, MEiN 70).

#### 5.4. Ocena transmisji patogenów alarmowych w placówkach ochrony zdrowia

Pracując zawodowo w medycznym laboratorium mikrobiologicznym (Zakład Mikrobiologii Klinicznej SU1), miałam okazję uczestniczyć w wieloośrodkowym badaniu oceniającym kolonizację układu pokarmowego pacjentów przyjmowanych do SU1. W latach 2017-2020 byłam członkiem międzynarodowego zespołu wykonującego badania finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, pt. „EmerGE-Net – effectiveness of infection control strategies against intra- and inter-hospital transmission of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*”. Mój udział w badaniach w ramach tego projektu polegał na ocenie kolonizacji układu pokarmowego pacjentów przyjmowanych do SU1 przez patogeny alarmowe z rzędu *Enterobacterales*. Badania były powtarzane podczas hospitalizacji pacjenta, jak również bezpośrednio przed jego wypisaniem ze szpitala. Uzyskane wyniki z kilku ośrodków, zlokalizowanych w różnych krajach Europy, posłużyły do stworzenia matematycznego modelu sieci powiązań epidemiologicznych i klinicznych. Zadaniem tego algorytmu było oszacowanie ryzyka wystąpienia kolonizacji pacjentów przez szczepy patogenów alarmowych i prawdopodobieństwa rozwinięcia zakażenia związanego z ochroną zdrowia.

Główną rolę w transmisji patogenów alarmowych w placówkach ochrony zdrowia mają ręce personelu, ale prawdopodobne są inne drogi, np. z udziałem owadów. Ten sposób transmisji udowodniono, np. u kleszczy. Pozwoliło to na postawienie hipotezy, że mucha domowa może stanowić wektor patogenów alarmowych na terenie szpitala. Byłam członkiem zespołu, który oceniał obecność patogenów alarmowych na odnóżach i w układzie pokarmowym na grupie badanej 100 much *Musca domestica* (46,0%), *Lucilia sericata* (28,0%) i *Calliphora vicina* (26,0%) bytujących na terenie szpitala. Stosując metodę spektrometrii mas (ang. matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI TOF MS) do identyfikacji wyhodowanych drobnoustrojów stwierdzono, że najczęściej izolowanymi z ciała much gatunkami bakterii są: *E. faecalis* (n = 64), *E. coli* (n = 43) i *Moellerella wisconsensis* (n = 24). Wykazano obecność tylko jednego szczepu, który jest uznanym patogenem alarmowym, tj. *P. mirabilis* ESBL(+). Na podstawie analizy uzyskanych wyników wwnioskowano, że muchy nie stanowią istotnego wektora w transmisji patogenów alarmowych (P32:



Wiktorczyk-Kapischke N, Skowron K, **Kwiecińska-Piróg J**, Białucha A, Wałęcka-Zacharska E, Grudlewska-Buda K, Kraszewska Z, Gospodarek-Komkowska E (2022): Flies as a potential vector of selected alert pathogens in a hospital environment. *Int J Environ Health Res* 32, 8: 1868-1887; IF 4,477, MEiN 70).

Wektorem drobnoustrojów w jednostkach ochrony zdrowia mogą być również powierzchnie urządzeń niedostatecznie reprocessowanych do powtórnego użycia, np. endoskopy. Poprawne przeprowadzenie procesów mycia i dezynfekcji endoskopów po ich użyciu w celu ustalenia diagnozy lub monitorowania skuteczności leczenia, a następnie prawidłowe jego przechowywanie jest istotne w kontekście bezpieczeństwa pacjentów. W związku z koniecznością wykonania takich badań, kierowałam zespołami wykonującymi badania dla dwóch podmiotów gospodarczych, których celem była weryfikacja poprawności dobrania parametrów mycia i dezynfekcji endoskopów w myjce ultradźwiękowej oraz warunków przechowywania endoskopów w zaprojektowanej do tego celu szafie (**R2, R7, R11**). Wyniki badań zostały przedstawione w publikacji (**P19**) (Wiktorczyk N, **Kwiecińska-Piróg J**, Skowron K, Michalska A, Zalas-Więcek P, Białucha A, Budzyńska A, Grudlewska-Buda K, Prażyńska M, Gospodarek-Komkowska E (2020): Assessment of endoscope cleaning and disinfection efficacy, and the impact of endoscope storage on the microbiological safety level. *J Appl Microbiol* 128: 1503-1513; IF 3,772, MEiN 70).

W zakresie oceny występowania patogenów alarmowych związanych ze środowiskiem szpitalnym podjęłam się analizy dotyczącej epidemiologii przypadków bakteriemii wywołanych przez *Proteus* spp. W celu określenia źródeł bakteriemii *Proteus* spp. analizowałam dostępną w Zakładzie Mikrobiologii Klinicznej SU1 bazę danych. Wyniki tej analizy wskazują, że źródłem dla wtórnej bakteriemii wywołanej pałeczkami *Proteus* spp. jest ZUM (46,6%). W prawie 50% przypadków bakteriemii nie można było jednak ustalić jej źródła. Izolaty wyosobnione z próbek krwi charakteryzowała słabsza zdolność tworzenia biofilmu ocenianego poprzez absorbancję fioletu krystalicznego niż izolaty wyosobnione z innego rodzaju materiału klinicznego pobranego od tego samego pacjenta (**P12**: Kwiecińska-Piróg J, Skowron K, Gospodarek-Komkowska E (2018): Primary and secondary bacteremia caused by *Proteus* spp.: epidemiology, strains susceptibility and biofilm formation. *Pol J Microb* 67: 471-478; IF 0,776, MEiN 15).

Zdolność tworzenia biofilmu przez drobnoustroje może być skorelowana z obecnością i ekspresją niektórych genów. Ocena obecności u szczepów *P. aeruginosa* genów, których ekspresja warunkuje tworzenie biofilmu, tj. *algD*, *pilA* i *pilD* była przedmiotem badań, w których brałam udział, analizując statystycznie uzyskane wyniki. W badaniach, których wyniki przedstawiono w pracy **P26** (Bogiel T, Depka D, Rzepka M, **Kwiecińska-Piróg J**, Gospodarek-Komkowska E (2021): Prevalence of the genes associated with biofilm and toxins synthesis amongst the *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antibiotics-Basel* 10: 241, 1-14 (IF 5,222, MEiN 70) wykazano, że u pałeczek *P. aeruginosa*

zdolność tworzenia biofilmu jest związana przede wszystkim z obecnością genów kodujących alginian obecny w otoczce komórki bakteryjnej niż z występowaniem fimbrii kodowanych przez gen *pilA* lub *pilB*.

Uzupełnieniem tego kierunku badań była ocena występowania genów powiązanych z czynnikami wirulencji pałeczek *P. aeruginosa*. Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że obecność genów odpowiedzialnych za występowanie mechanizmów oporności na antybiotyki *P. aeruginosa* jest ujemnie skorelowana z obecnością niektórych genów kodujących czynniki wirulencji (P23: Bogiel T, Prażyńska M, Kwiecińska-Piróg J, Mikucka A, Gospodarek-Komkowska E (2021): Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains-distribution of the essential enzymatic virulence factors genes. Antibiotics-Basel 10: 8, 1-10; IF 5,222, MEiN 70).

### 5.5. SARS-CoV-2

Podczas pandemii SARS-CoV-2 realizowałam jako kierownik naukowy projekt, pt. „Występowanie i określenie dynamiki zmian przeciwciał klasy IgA i IgG przeciwko SARS-CoV-2 w surowicy pracowników ochrony zdrowia”. Przedmiotem badań była ocena stężenia przeciwciał w klasie IgA oraz IgG metodą półilościową w surowicy osób badanych w okresie od czerwca 2020 roku do lutego 2021 roku. Celem badania było określenie trendu zmian stężenia przeciwciał u chorych, u których doszło do zakażenia SARS-CoV-2. W końcowej fazie badań oceniano stężenie przeciwciał u osób po przyjęciu szczepienia przeciwko SARS-CoV-2, które wcześniej przechorowały COVID-19, i u osób, u których nie doszło wcześniej do zakażenia (które przez cały okres prowadzonego badania wykazywały ujemne wyniki na obecność przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2). Ponadto, we współpracy z Katedrą Diagnostyki Laboratoryjnej CM UMK oceniono w surowicy stężenie witaminy D, aby oszacować korelację pomiędzy stężeniem przeciwciał oraz stężeniem tej witaminy. Witaminę D wybrano ze względu na jej potencjalną immunomodulacyjną rolę w przebiegu zakażeń układu oddechowego. Ma ona hamujący wpływ na poziom kilku cytokin, które są związane z piorunującym przebiegiem COVID-19, np. interleukina-6 (IL-6), czynnik martwicy nowotworu alfa (TNF- $\alpha$ ) i interferon-gamma (IFN $\gamma$ ).

Dynamiczny wzrost stężenia przeciwciał klasy IgA i IgG wykazano już po pierwszej dawce szczepionki u wszystkich badanych osób. Stężenie IgG oceniane po przyjęciu pierwszej dawki szczepionki mRNA (Pfizer) u osób, które wcześniej przechorowały zakażenie SARS-CoV-2 było istotnie wyższe niż u osób, które wcześniej nie wykształciły odporności immunologicznej przeciwko SARS-CoV-2 (wykazywały ujemne wyniki na obecność IgA i IgG przed rozpoczęciem szczepień). Stężenia przeciwciał IgG po drugiej dawce szczepienia były porównywalne w obydwu grupach osób, co świadczy o konieczności przyjęcia drugiej dawki, w szczególności przez osoby, które nie przechorowały COVID-19. Nie stwierdzono natomiast związku pomiędzy stężeniem przeciwciał w żadnej z grup a poziomem

witaminy D w surowicy krwi (**P29: Kwiecińska-Piróg J**, Przekwas J, Kraszewska Z, Sękowska A, Brodzka S, Wiktorczyk-Kapischke N, Grudlewska-Buda K, Wałęcka-Zacharska E, Zacharski M, Mańkowska-Cyl A, Gospodarek-Komkowska E, Skowron K (2021): The differences in the level of anti-SARS-CoV-2 antibodies after mRNA vaccine between convalescent and non-previously infected people disappear after the second dose - study in healthcare workers group in Poland. *Vaccines* 9: 1-15; IF 4,961, MEiN 140).

Oprócz szczepień, w profilaktyce zakażeń SARS-CoV-2 istotne są działania polegające na ograniczeniu dróg transmisji tego wirusa i określenie jego potencjalnych rezerwuarów. Istnieje wiele publikacji, w których przedstawiono wyniki dotyczące określonej powierzchni lub sposobu transmisji wirusa odpowiedzialnego za COVID-19. Aby móc wyciągnąć ogólne wnioski, należy zebrać dostępne w publikacjach informacje i je ze sobą porównać. W tym celu zespół, którego byłam członkiem, dokonał analizy danych wraz elementami meta-analizy, a ich wyniki przedstawiono w dwóch publikacjach (**P27: Grudlewska-Buda K, Wiktorczyk-Kapischke N, Wałęcka-Zacharska E, Kwiecińska-Piróg J, Buszko K, Leis K, Juszczyk K, Gospodarek-Komkowska E, Skowron KJ** (2021): SARS-CoV-2: morphology, transmission and diagnosis during pandemic, review with element of meta-analysis: *Clin Med* 10: 1-33; IF 4,964, MEiN 140 oraz **P28: Wiktorczyk-Kapischke N, Grudlewska-Buda K, Wałęcka-Zacharska E, Kwiecińska-Piróg J, Radtke L, Gospodarek-Komkowska E, Skowron K** (2021): SARS-CoV-2 in the environment: non-droplet spreading routes. *Sci Total Environ* 770: 1-20; IF 10,753, MEiN 200).

Na podstawie dostępnych danych stwierdzono, że wnioski uzyskane z badań epidemiologicznych i określenia potencjału epidemiologicznego związanego z transmisją SARS-CoV-2 inną niż kropelkowa, powinny być wyciągane nie tylko na podstawie stwierdzenie samej obecności materiału genetycznego SARS-CoV-2 na danej powierzchni, ale powinny zostać uwzględnione wyniki oceny liczby cząstek infekcyjnych wirusa, które wskazują na realne zagrożenie związane z ich obecnością w danej lokalizacji. W kontekście środowiska szpitalnego, istotne wydaje się wyeliminowanie zbędnych powierzchni, urządzeń czy przedmiotów z otoczenia chorego, szczególnie tych wykonanych z polimerów. Należy także zwrócić uwagę na właściwą higienę toalet pacjentów i personelu, gdyż nie można, na podstawie dostępnych danych, wykluczyć transmisji SARS-CoV-2 wraz ze ściekami.

Obecnie wiadomo, że SARS-CoV-2, pomimo szeroko wprowadzonej profilaktyki szczepień, nadal wywołuje zakażenia. Konieczne jest poszukiwanie metod leczenia, które mogą złagodzić przebieg choroby i ograniczyć lub nawet wyeliminować możliwe powikłania. Potencjalne zastosowanie mogą mieć antyoksydanty, m.in., kwas askorbinowy. Dotychczasowa wiedza dotycząca możliwości zastosowania witaminy C uwzględniona w dostępnym piśmiennictwie została przedstawiona w pracy poglądowej (**P35**), pt. „The variable nature of vitamin C - does it help when dealing with coronavirus? autorstwa: Grudlewska-Buda K, Wiktorczyk-Kapischke N, Budzyńska A, **Kwiecińska-Piróg J**, Przekwas J,

Kijewska A, Sabinarz D, Gospodarek-Komkowska E, Skowron K, która ukazała się w czasopiśmie *Antioxidants* (2022, 11: 1-29; IF 7,675, MEiN 100). Po analizie wyników dostępnych badań, opierających się głównie na opisach przypadków leczenia pacjentów ze zdiagnozowanym COVID-19 oraz wynikach nielicznych meta-analiz w tym temacie, postawiono wniosek, że ani doustna suplementacja witaminy C, ani podawanie pacjentom wysokich dawek tej witaminy dożylnie, nie wpływa na zmniejszenie śmiertelności wśród pacjentów zakażonych SARS-CoV-2. Istnieją natomiast przesłanki do postawienia hipotezy, że podawanie pacjentom witaminy C zmniejsza ryzyko powikłań po przechorowaniu COVID-19, przede wszystkim zakrzepicy. Wymaga to jednak prowadzenia dalszych badań. W żadnym z badań nie wykazano negatywnego działania witaminy C na stan kliniczny pacjenta, a w większości wykazywano zmniejszenie poziomów laboratoryjnych wykładników stanu zapalnego (białko C-reaktywne, prokalcytonina) i stężenia interleukin prozapalnych.

Metodą profilaktyki COVID-19 jest również higiena i dezynfekcja rąk. Częste stosowanie środków do dezynfekcji skóry może jednak wpływać na jej mikrobiom. W celu weryfikacji tej hipotezy wspólnie z naukowcami z Politechniki Bydgoskiej i Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu dokonaliśmy przeglądu dostępnego piśmiennictwa na temat mikrobiomu skóry oraz wpływu różnych czynników zewnętrznych i wewnętrznych na jej funkcjonowanie (**P24**: Skowron K, Bauza-Kaszewska J, Kraszewska Z, Wiktorczyk-Kapischke N, Grudlewska-Buda K, **Kwiecińska-Piróg J**, Wałęcka-Zacharska E, Radtke L, Gospodarek-Komkowska E (2021): Human skin microbiome: impact of intrinsic and extrinsic factors on skin microbiota. *Microorganisms* 9: 1-20; IF 4,926, MEiN 40). Z analizy danych wynika, że częste stosowanie środków do dezynfekcji dłoni nie zmienia składu mikrobiomu skóry, a najskuteczniejsze w eliminacji SARS-CoV-2 z powierzchni skóry są preparaty oparte na alkoholu (etanol, propanol). Zagadnienie dotyczące mikrobiomu skóry, ze względu na jego złożoność i odmienność w zależności od lokalizacji, jest interesujące i wymaga dalszych badań, również w zakresie biofilmu.

## 6. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ LUB SZTUKĘ

### 6.1. Osiągnięcia dydaktyczne

Jako nauczyciel akademicki od 2008 roku prowadzę zajęcia dydaktyczne ze studentami Wydziału Farmaceutycznego (analityka medyczna, farmacja, kosmetologia), Lekarskiego (lekarski, biotechnologia medyczna) oraz Nauk o Zdrowiu (pielęgniarstwo, ratownictwo medyczne, położnictwo). Realizuję zajęcia także ze studentami studiów anglojęzycznych (lekarski, pielęgniarstwo) CM UMK oraz ze studentami w ramach programu ERASMUS (pielęgniarstwo). Prowadzę różne formy zajęć (seminaria, laboratoria i ćwiczenia) z przedmiotów: mikrobiologia, mikrobiologia ogólna, diagnostyka mikrobiologiczna, praktyczna nauka zawodu, wykłady fakultatywne dotyczące diagnostyki mikrobiologicznej i interpretacji wyników badań mikrobiologicznych dotyczących przypadków klinicznych. W 2015 roku otrzymałam wyróżnienie przyznane przez studentów dla nauczyciela akademickiego ze średnią ocen powyżej 4,95. Co roku średnia moich ocen za zajęcia dydaktyczne wynosi powyżej 4,80 (N1).

W kwietniu 2022 roku byłam opiekunem stażu studenckiego w ramach programu KA107 ERASMUS+ organizowanego przez Wydział Farmaceutyczny CM UMK.

W lipcu 2022 roku sprawowałam opiekę nad studentką z Belgii realizującą staż w laboratorium mikrobiologicznym zainicjowany przez IFMSA-Polska.

Do moich obowiązków jako nauczyciela akademickiego należy opieka nad pracami dyplomowymi studentów naszej Uczelni. Byłam opiekunem ogółem 29 prac magisterskich i dwóch licencjackich, realizowanych przez 22 studentów kierunku analityka medyczna, 7 - kierunku farmacja, oraz dwóch - kierunku biotechnologia. Zrealizowane prace magisterskie pod moją opieką zostały kilkakrotnie nagrodzone na poziomie Uczelni lub w ramach konkursów ogólnopolskich:

- mgr Jana Przekwas: „Wpływ naturalnych produktów pochodzenia pszczelego na zdolność tworzenia biofilmu przez pałeczki *Proteus mirabilis* izolowane z zakażeń ran przewlekłych” - II nagroda w Ogólnopolskim Konkursie Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych dla absolwentów kierunku analityka medyczna, 2018 (A1),
- mgr Julia Panasiuk: „Wpływ antybiotyków beta-laktamowych na zdolność tworzenia biofilmu przez pałeczki *Proteus mirabilis*” - III nagroda w konkursie prac dyplomowych Wydziału Farmaceutycznego CM UMK, 2019 (A2),
- mgr Jakub Gębalski: „Wpływ antyoksydantów i fluorochinolonów na tworzenie biofilmu przez pałeczki *Proteus mirabilis*” - II nagroda w konkursie prac dyplomowych Wydziału Farmaceutycznego CM UMK dla mgr farmacji, 2018 (A3).

W ramach pracy dydaktycznej opiekuję się studentami kierunku analityka medyczna i farmacja należącymi do Studenckiego Koła Naukowego (SKN) działającego przy Katedrze Mikrobiologii CM UMK. Efektem pracy ze studentami jest, m.in., uzyskanie finansowania i realizacja projektów studenckich badań naukowych, pt.:

- „Wykorzystanie pomiaru fluorescencji za pomocą zestawu Live/Dead BacLight w ocenie oddziaływań pomiędzy gentamicyną i azytromycyną wobec biofilmu” (studentka kierunku analityka medyczna, Marta Sylka, 2021),
- „Ocena częstości występowania beta-laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym wśród szczepów *Proteus mirabilis*” (studentka kierunku analityka medyczna, Magdalena Olszewska, 2019),
- „Ocena częstości występowania wybranych czynników wirulencji u szczepów *Proteus mirabilis* izolowanych z zakażeń układu moczowego” (student kierunku farmacja, Jakub Gębalski, 2018).

Wyniki badań realizowanych w ramach działalności SKN zostały przedstawione z udziałem studentów podczas konferencji i/lub opublikowane w rozdziałach monografii:

- Przekwas J, **Kwiecińska-Piróg J**, Sylka M, Gospodarek-Komkowska E: Optymalizacja metody oceny komórek żywych i martwych w biofilmie za pomocą fluorescencji (live/dead baclight bacterial viability kit). VII Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen. Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytet Łódzki. Łódź, 07-08 IV 2022 (**M8**),
- Porada M, Wąsicki M, Modrzejewski M, Przekwas J: Urinary tract infection as one of the most common seniors infections. Bukovinian International Medical Congress. Ukraine, 2-5 V 2019 – III nagroda (**A4**),
- Gębalski J, **Kwiecińska-Piróg J**, Gospodarek E: Wpływ fluorochinolonów, kwasu askorbinowego oraz rutozydu na tworzenie biofilmu przez szczepy *Proteus mirabilis*. III Ogólnopolska Mikrobiologiczna Konferencja Naukowa MICROBS. Dwikozy, 17–18 V 2018,
- Przekwas J, **Kwiecińska-Piróg J**, Gospodarek-Komkowska E: Wpływ naturalnych produktów pochodzenia pszczelego na zdolność tworzenia biofilmu przez pałeczki *Proteus mirabilis* izolowane z zakażeń ran przewlekłych. III Ogólnopolska Mikrobiologiczna Konferencja Naukowa MICROBS. Dwikozy, 17–18 V 2018,
- Przekwas J, **Kwiecińska-Piróg J**, Gospodarek-Komkowska E: Wpływ miodu Manuka na tworzenie biofilmu i wzrost mgławicowy *Proteus mirabilis*. [w:] M. Maciąg, K. Maciąg (red.): Mikrobiologia medyczna i środowiskowa – wybrane zagadnienia. Wydaw. Nauk. TYGIEL. Lublin, 2017: 112-125,
- Gajek A, **Kwiecińska-Piróg J**, Gospodarek-Komkowska E: Ocena wytwarzania biofilmu przez szczepy *Proteus mirabilis* izolowane z ran przewlekłych. [w:] M. Maciąg, K. Maciąg (red.):

Mikrobiologia medyczna i środowiskowa - wybrane zagadnienia. Wydaw. Nauk. TYGIEL. Lublin, 2017: 148-159.

Do mojej działalności dydaktycznej zaliczyć można współautorstwo w tworzeniu podręczników przeznaczonych dla studentów w ramach kształcenia dyplomowego i podyplomowego, przede wszystkim studentom kierunku kosmetologia i lekarskiego, jak i specjalizujących się w dermatologii i medycynie estetycznej:

- „Mikrobiologia w kosmetologii” pod red. naukową E. Gospodarek i A. Mikuckiej. Wydawnictwo PZWL 2013 - jeden rozdział (Prażyńska M, **Kwiecińska-Piróg J**: „Grzyby – znaczenie w kosmetologii”: 65 - 77(**M1**),
- „Mikrobiologia w dermatologii, wenerologii oraz w medycynie estetycznej i kosmetologii” pod red. naukową E. Gospodarek-Komkowskiej i A. Mikuckiej. Wydawnictwo PZWL 2021 – trzy rozdziały:
  - a. Sękowska A, Kwiecińska-Piróg: Wirusy – znaczenie w dermatologii, wenerologii oraz w medycynie estetycznej i kosmetologii: 65 - 88 (**M4**),
  - b. Prażyńska M, **Kwiecińska-Piróg J**: Grzyby – znaczenie w dermatologii, wenerologii, medycynie estetycznej i kosmetologii: 109 - 118 (**M5**),
  - c. Zalas-Więcek P, Michalska A, **Kwiecińska-Piróg J**: Wybrane zakażenia odzwierzęce w dermatologii: 125 - 134 (**M6**).

Jestem współautorem (Skowron K, Wiktorczyk-Kapischke N, Grudlewska-Buda K, Wałęcka-Zacharska E, **Kwiecińska-Piróg J**) rozdziału, pt. „Other microwave-assisted processes: microwaves as a method ensuring microbiological safety of food” w książce, pt. “Innovative and emerging technologies in the bio-marine food sector applications, regulations, and prospects” pod red. nauk. Marco Garcia-Vaquero i Gaurav Rajauria. 2022 Elsevier Inc. (**M7**).

Jestem promotorem pomocniczym doktorantki kształcącej się w Szkole Doktorskiej Nauk Medycznych i Nauk o Zdrowiu CM UMK. Doktorantka została zakwalifikowana do kształcenia w roku akademickim 2019/2020 i realizuje projekt badawczy związany z oceną wpływu antybiotyków na biofilm Gram-ujemnych bakterii z gatunku *P. aeruginosa* i *P. mirabilis* izolowanych z zakażeń ran przewlekłych.

W ramach kształcenia specjalizacyjnego dla diagnostów laboratoryjnych w dziedzinie mikrobiologii medycznej byłam kierownikiem naukowym, pierwszego organizowanego po uzyskaniu przez CM UMK akredytacji, kursu specjalizacyjnego, pt. „Oporność drobnoustrojów na antybiotyki: podstawy teoretyczne, laboratoryjne metody oznaczania wrażliwości szczepów na antybiotyki i chemioterapeutyki, wykrywanie mechanizmów oporności”. W ramach kursu prowadziłam wykłady i seminaria oraz byłam odpowiedzialna za przygotowanie i przeprowadzenie testu końcowego weryfikującego efekty uczenia.

## 6.2. Osiągnięcia organizacyjne

Realizuję działalność organizacyjną zarówno na studiach dyplomowych, jak i podyplomowych prowadzonych przez Wydział Farmaceutyczny CM UMK.

Od 2019 roku jestem powołana przez Dziekana Wydziału Farmaceutycznego CM UMK do kierowania i nadzorowania zawodowych praktyk studentów kierunku analityka medyczna naszej Uczelni na terenie Polski. Do moich zadań w tym zakresie należy koordynowanie przebiegu praktyk przypisanego rocznika studentów, kontakt z jednostkami, w których odbywa się praktyka i pomoc studentom w realizacji wymaganych programem praktyk zawodowych. Na podstawie informacji uzyskiwanych od bezpośrednich opiekunów praktyk, przygotowuję protokół, na podstawie którego wyciągane są wnioski dotyczące poprawy realizacji praktyk zawodowych oraz doskonalenia jakości kształcenia studentów, szczególnie w aspekcie przyszłej pracy zawodowej naszych absolwentów.

W latach 2019 – 2021 pełniłam funkcję opiekuna studentów I roku kierunku analityka medyczna. Obecnie jestem powołana do pełnienia tej funkcji w roku akademickim 2022/2023. Moim zadaniem jest wspieranie studentów na początku ich studenckiej ścieżki rozwoju. Co jest szczególnie istotne, moje działanie w tym zakresie przypadło na okres pandemii i zdalnego nauczania, co stanowiło duże wyzwanie zarówno dla kadry prowadzącej zajęcia, jak również dla studentów rozpoczynających swoją naukę w szkole wyższej.

Od lutego 2021 roku pełnię funkcję Pełnomocnika Rektora ds. specjalizacji dla diagnostów laboratoryjnych w CM UMK. Wraz z członkami Zespołu doradczego Rektora uzyskaliśmy akredytację do prowadzenia szkolenia specjalizacyjnego w dwóch dziedzinach, tj. laboratoryjnej diagnostyki medycznej i mikrobiologii medycznej. W 2022 roku uruchomiliśmy pierwszy cykl szkolenia specjalizacyjnego w obu dziedzinach, który koordynuję jako kierownik zespołu doradczego. Moim zadaniem jest, m.in., kontakt z Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie, Wydziałem Kształcenia Kadr Medycznych Urzędu Wojewódzkiego w Bydgoszczy, placówkami realizującymi staże kierunkowe i kursy specjalizacyjne, kierownikami specjalizacji i uczestnikami kształcenia specjalizacyjnego. Obecnie Zespół stara się o uzyskanie akredytacji do prowadzenia szkolenia w dziedzinie laboratoryjnej transfuzjologii medycznej. Zaczynamy przygotowania do organizacji kursów i warsztatów w ramach szkolenia ciągłego diagnostów laboratoryjnych.

Aktualnie pełnię funkcję kierownika specjalizacji dla jednej osoby realizującej kształcenie specjalizacyjne w dziedzinie mikrobiologii medycznej. Moim zadaniem jest koordynowanie procesu szkolenia uczestnika specjalizacji, nadzór nad poprawnością i terminowością realizowanych kursów i staży kierunkowych oraz nadzór nad całym przebiegiem szkolenia przypisanego uczestnika specjalizacji.



Do pozadydaktycznej działalności organizacyjnej mogę zaliczyć udział w komitetach organizacyjnych:

1. Konferencji międzynarodowej, pt. „The last word belongs to microbes – celebrating the 200<sup>th</sup> anniversary of the birth of Louis Pasteur”, Warszawa, 29-30 XI 2022
2. Pięciu konferencji o zasięgu ogólnopolskim, tj.:
  - I Konferencja Ogólnopolska „Drobnoustroje w świecie człowieka - drobnoustroje oportunistyczne”, Bydgoszcz, 18-20 IX 2014,
  - Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Działania przeciwdrobnoustrojowe. Drobnoustroje – wpływ czynników fizycznych i chemicznych”, Bydgoszcz, 24 VI 2015 (sekretarz komitetu organizacyjnego),
  - II Ogólnopolska Konferencja „Drobnoustroje w świecie człowieka - drobnoustroje oportunistyczne”, Bydgoszcz, 20-21 V 2016,
  - XXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, Bydgoszcz, 25-27 IX 2016,
  - III Ogólnopolska Konferencja „Drobnoustroje w świecie człowieka - drobnoustroje oportunistyczne”, Bydgoszcz, 18-19 VI 2018.

W latach 2019 - 2020 byłam edytorem pomocniczym w numerze specjalnym czasopisma MDPI *Microorganisms*, pt. "Bacterial biofilms and its eradication in food industry" (CE1). Obecnie pełnię funkcję pomocniczego edytora w czasopiśmie MDPI *Antibiotics*, w numerze specjalnym, pt. „Antimicrobial resistance along the food chain: are we what we eat?” (CE2)

### 6.3. Osiągnięcia popularyzujące naukę

Dotychczas uczestniczyłam w wymienionych okazjonalnych pracach organizacyjnych na rzecz Uczelni i Wydziału (Dni Otwarte, Festiwal Nauki, itp.):

- Przygotowanie i przeprowadzenie warsztatów podczas Dnia Nauki „MEDICALIA” w latach: 2012 (CSo1), 2013 (CSo3) 2016 (CSo6),
- Przygotowanie i przeprowadzenie zajęć podczas Drzwi Otwartych Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu w 2013 (CSo2) i 2014 roku (CSo4),
- Przygotowanie wykładu popularnonaukowego w ramach cyklu Medyczna Środa, pt. „Pogawędki drobnoustrojów, czyli quorum sensing w biofilmach”: Skowron K, Grudlewska K, Kwiecińska-Piróg J, Gospodarek-Komkowska E w 2016 roku (CSo5),
- Przygotowanie i przeprowadzenie warsztatów, pt. „Na tropie bakterii. Jak wyglądają i gdzie mieszkają bakterie?” w ramach Bydgoskiego Festiwalu Nauki w 2017 (CSo7) i 2019 r (Cso8),

- Przeprowadzenie warsztatów z mikrobiologii dla uczestników XV Ogólnopolskiej Debaty Studentów Analizy Medycznej w 2019 roku (**CSo9**),
- Przeprowadzenie części teoretycznej i praktycznej z zakresu mikrobiologii w ramach II Bydgoskich Symulacji Diagnostycznych w 2020 roku (**CSo10**),
- Wystąpienie podczas spotkania „Akcja specjalizacja” organizowanego przez Studenckie Towarzystwo Diagnostyki Laboratoryjnej (STDŁ) CM UMK w 2021 roku (**CSo11**).

## **7. INNE WAŻNE INFORMACJE, DOTYCZĄCE KARIERY ZAWODOWEJ**

### **7.1. Udział w szkoleniach i warsztatach**

W celu doskonalenia wiedzy brałam udział w następujących spotkaniach naukowych, warsztatach i konferencjach:

- III Pomorskie Spotkania z Mikrobiologią. Cetniewo, 17-18 XI 2011 (**K1**),
- IV Pomorskie Spotkania z Mikrobiologią. Bydgoszcz, 20-21 IX 2013 (**K2**),
- Sympozjum z okazji Europejskiego Dnia Wiedzy o Antybiotykach, Bydgoszcz, 02 XII 2013 (**K3**),
- I Ogólnopolskiej Konferencji „Drobnoustroje w świecie człowieka – drobnoustroje oportunistyczne”. Bydgoszcz, 18-20 IX 2014 (**K4**),
- Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Działania przeciwdrobnoustrojowe. Drobnoustroje – wpływ czynników fizycznych i chemicznych”. Bydgoszcz, 24 VI 2015 (**K5**),
- II Ogólnopolska Konferencja „Drobnoustroje w świecie człowieka – drobnoustroje oportunistyczne”. Bydgoszcz, 20-21 V 2016 (**K6**),
- XXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów „Mikrobiologia – nowe wyzwania, nowe możliwości”. Bydgoszcz, 25-27 IX 2016 (**K7**),
- International Conference of natural and medical sciences: young scientists, PhD Students, and Students. Lublin, 01-03 XII 2017 (**K8**),
- X Jubileuszowe Ogólnopolskie Sympozjum “Biofilm tworzony przez drobnoustroje w patogenezie zakażeń”. Kudowa Zdrój, 17-19 V 2019 (**K9**),
- III Ogólnopolska Konferencja „Drobnoustroje w świecie człowieka – drobnoustroje oportunistyczne”. Bydgoszcz, 18-19 VI 2018 (**K10**),
- Posiedzenia szkoleniowo-naukowe: „*Clostridium difficile* – epidemiologia i diagnostyka” „Oporne pączki Gram-ujemne”, „Aktualności KIDL”. Bydgoszcz, 16 III 2018 (**K11**),
- Posiedzenie naukowo-szkoleniowym z okazji Dnia Diagnosty Laboratoryjnego. Bydgoszcz, 27 V 2019 (**K12**),
- Szkolenie „Diagnostyka COVID-19”, forma zdalna, 18 II 2021 (**K13**),
- III posiedzenie Naukowo-Szkoleniowe online Ogólnopolskie Spotkania Mikrobiologów i Epidemiologów: „COVID-19”, „Diagnostyka mikrobiologiczna”, „Dezynfekcja i prawidłowa gospodarka odpadami medycznymi i ich rola w profilaktyce zakażeń szpitalnych”, „Antybiotykoterapia – zastosowanie „starych” antybiotyków w nowej odsłonie”; forma zdalna, 01 III 2021 (**K14**),
- Szkolenie „Bezpieczeństwo informacji – security awareness” i „Nowe podejście do ochrony danych osobowych po wejściu RODO”, forma zdalna, 24 IV 2021 (**K15**),

- Spotkanie edukacyjne „Kontrola czystości powierzchni w szpitalu jako prewencja zakażeń” i „Bezszwowa stabilizacja i ochrona bakteriobójcza – wszystko czego potrzebujesz, aby zabezpieczyć dostęp naczyniowy i nie bać się zakażeń”, Jachranka, 12-14 V 2022 (**K16**),
- II Forum Zakażeń. Jachranka, 12-14 V 2022 (**K17**).
- Spotkania naukowe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów Oddział w Bydgoszczy (**K18 a-h**)  
Uzupełnieniem szkoleń teoretycznych był udział w warsztatach i szkoleniach o charakterze praktycznym. W ramach zatrudnienia w CM UMK ukończyłam następujące warsztaty:
  - kurs, pt. „Zastosowania statystyki w analizie wyników badań medycznych” organizowany przez StatSoft Polska, 2013 (**CS1**),
  - szkolenie z zakresu obsługi i prawidłowego użytkowania oraz przepisów BHP podczas pracy z autoklawem mikrofalowym firmy Enbiojet, 2014 (**CS2**),
  - warsztaty, pt. „Droplet digital PCR – PCR trzeciej generacji” organizowane przez firmę Bio-Rad, 2016 (**CS6**),
  - udział w szkoleniu aplikacyjnym z obsługi aparatu cobas z480 User Defined Workflow przeprowadzonym przez firmę Roche Diagnostic Polska Sp. z o.o., 2017 (**CS7**),
  - szkolenie z obsługi czytnika multidetekcyjnego HIDEX Sense Beta Plus organizowanym przez firmę ICLab sp. z o.o., 2022 (**CS13**).

W ramach zatrudnienia w Zakładzie Mikrobiologii Klinicznej SU1 na stanowisku asystenta diagnostyki laboratoryjnej brałam udział w licznych szkoleniach i warsztatach dotyczących obsługi aparatów wykorzystywanych w diagnostyce mikrobiologicznej zakażeń człowieka, m.in.:

- przygotowanie próbki i obsługa aparatu illumipro-10 używanego w metodzie molekularnej illumigene firmy Meridian Bioscience organizowanym przez firmę Argenta Sp. z o.o., 2014 (**CS3**),
- z zakresu spektrometrii mas (MALDI TOF MS) w identyfikacji drobnoustrojów i obsługi IVD MALDI Biotyper (Bruker), 2015 (**CS4**),
- administracji i obsługi programu Boomerang do automatycznego monitorowania temperatury urządzeń i pomieszczeń (Scandinavia ICU®) drogą radiową, 2016 (**CS5**),
- wykorzystania aparatu miniVIDAS w diagnostyce zakażeń metodami immunologicznymi zorganizowane przez firmę bioMérieux Polska sp. z o.o., 2018 (**CS8**),
- diagnostyka boreliozy z użyciem testów Immunoblot i obsługa programu EUROLineScan zorganizowane przez firmę EUROIMMUN POLSKA sp. z o.o., 2018 (**CS9**),
- warsztatach użytkowników BD Phoenix™ - systemu do identyfikacji i oznaczania lekowrażliwości drobnoustrojów (**CS10**) i systemów BD Phoenix 100 i BD Phoenix M50, 2019 (**CS11**),

- szkolenie merytoryczne i praktyczne z zakresu oznaczania (1->3)-beta-D-glukanu testem Fungitell firmy Associates of Cape Cod, Inc., 2020 (**CS12**),
- szkolenie z obsługi i konserwacji urządzenia EasySpital Dilute firmy Interscience organizowanym przez Argenta Sp. z o.o. Sp. k., 2022 (**CS14**).

## **7.2. Staże naukowe**

Od października 2021 roku do lutego 2022 roku odbywałam staż naukowy w Katedrze Chemii Instytutu Nauk o Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Tematem stażu była spektroskopowa ocena biofilmów bakteryjnych tworzonych w różnych warunkach środowiskowych i poddawanych działaniu różnych czynników, w tym antybiotyków i związków pochodzenia naturalnego (**St\_1**).

## **7.3. Recenzowanie publikacji**

W latach 2017 – 2022 recenzowałam 11 prac oryginalnych oraz jedną pracę poglądową dla anglojęzycznych czasopism: International Journal of Environmental Research and Public Health (4; **CR1**), Life, Antibiotics, Microorganisms (3; **CR2**), Frontiers in Microbiology (1), BMC Microbiology (3; **CR3\_A**, **CR3\_B**) oraz Biofouling (1).

## **7.4. Członkostwo w towarzystwach naukowych**

Byłam członkiem międzynarodowych i krajowych towarzystw naukowych:

- European Committee on Infection Control (EUCIC) – członek komitetu krajowego w latach 2015-2021,
- Krajowy Komitet Konsultacyjny LabTests Online – członek w latach 2015-2020.

W dwóch towarzystwach naukowych pełnię określone funkcje:

- Polskie Towarzystwo Mikrobiologów – członek od 2013 roku, przewodnicząca Komisji Rewizyjnej PTM Oddział w Bydgoszczy od 2016 roku,
- Stowarzyszenie „Rozwój Mikrobiologii” – skarbnik od 2011 roku.

## **7.5. Współpraca z gospodarką**

Od kilku lat współpracuję z otoczeniem gospodarczym w zakresie badań mikrobiologicznych. Dotyczą one głównie nowych technologii, które mają potencjalne zastosowanie przeciwdrobnoustrojowe. Jestem autorem lub współautorem 17 ekspertyz / raportów z badań zrealizowanych dla firm z terenu Polski.

	Podmiot zlecający badanie	Tytuł raportu	Skład zespołu badawczego
<b>R1</b>	ActivTek Sp. z o. o., Kielce (2016)	Ocena liczby jednostek tworzących kolonie wybranych gatunków bakterii i grzybów w powietrzu ( <b>R1_1</b> ) i na badanych powierzchniach ( <b>R1_2</b> ) po zastosowaniu urządzenia Induct 750 firmy ActivTek	Gospodarek-Komkowska E, Skowron K, <b>Kwiecińska-Piróg J</b> , Grudlewska K
<b>R2</b>	TRIBO Sp. z o. o., Nowa Wieś Wielka (2017)	Badania mikrobiologiczne szafy do przechowywania termolabilnych endoskopów w kontrolowanym środowisku produkcji firmy TRIBO Sp. z o. o. pod nazwą „Komora do przechowywania endoskopów” model SK 05320, przeprowadzone na podstawie polskiej normy PN-EN 16442_2015 z maksymalnym, 7-dniowym czasie umieszczenia endoskopów	<b>Kwiecińska-Piróg J</b> , Skowron K, Grudlewska K, Zalas-Więcek P, Michalska A, Białucha A, Bogiel T, Gospodarek-Komkowska E
<b>R3</b>	Instytut Obróbki Plastycznej, Poznań (2018)	Ocena tworzenia biofilm przez <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC®35984™ oraz <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC®700829™ na powierzchni materiałów stosowanych do wytwarzania implantów kostnych	<b>Kwiecińska-Piróg J</b> , Gospodarek-Komkowska E
<b>R4</b>	Wojskowa Akademia Techniczna, Warszawa (2018)	Określenie warunków pracy (temperatura pracy, natężenie przepływu powietrza, stężenie cząstek biologicznych) zapewniających maksymalną efektywność oczyszczania powietrza z toksycznych czynników biologicznych z użyciem przedprototypu urządzenia doświadczalnego	Gospodarek-Komkowska E, Skowron K, <b>Kwiecińska-Piróg J</b> , Wiktorczyk-Kapischke N
<b>R5</b>	Wojskowa Akademia Techniczna, Warszawa (2018)	Weryfikacja efektywności oczyszczania powietrza z toksycznych czynników biologicznych z użyciem ostatecznej wersji urządzenia doświadczalnego (po korektach konstrukcyjnych/materiałowych). Określenie optymalnych warunków pracy urządzenia	Gospodarek-Komkowska E, Skowron K, <b>Kwiecińska-Piróg J</b> , Wiktorczyk-Kapischke N
<b>R6</b>	Varimed Sp. z o. o., Wrocław (2019)	Mikrobiologiczne badania myjni endoskopowej Endocleaner firmy Aort przeprowadzone zgodnie z normą PN-EN ISO 15883	<b>Kwiecińska-Piróg J</b> , Skowron K, Budzyńska A, Michalska A, Zalas-Więcek P, Wiktorczyk-Kapischke N, Gospodarek-Komkowska E
<b>R7</b>	TRIBO Sp. z o. o., Nowa Wieś Wielka (2019)	Pilotażowe badania mikrobiologiczne pozwalające na ocenę skuteczności prototypu modułu poprawiającego jakość mikrobiologiczną powietrza przeznaczonego do zainstalowania w „Szafie do przechowywania leków”	<b>Kwiecińska-Piróg J</b> , Skowron K, Gospodarek-Komkowska E
<b>R8</b>	ActivTek Medica Sp. z o.o., Kielce (2019)	Ocena przeżywalności szczepów <i>Salmonella</i> spp. na powierzchni skorup jaj kurzych pod wpływem działania urządzenia Induct 750 firmy ActivTek	Skowron K, <b>Kwiecińska-Piróg J</b> , Wiktorczyk N, Gospodarek-Komkowska E

	Podmiot zlecający badanie	Tytuł raportu	Skład zespołu badawczego
R9	ActivTek Medica Sp. z o.o., Kielce (2019)	Ocena przeżywalności szczepów <i>Klebsiella pneumoniae</i> wytwarzających metalo-beta-laktamazy typu NDM na wybranych powierzchniach pod wpływem działania promieniowej jonizacji katalitycznej wykorzystanej w urządzeniach Induct 750 firmy ActivTek.	Skowron K, <b>Kwiecińska-Piróg J</b> , Wiktorczyk N, Sękowska A, Gospodarek-Komkowska E
R10	Adamus Implantmed Sp. z o. o., Węgorzyno (2019)	Badanie jałowości implantu po procesie sterylizacji dostarczonego przez firmę Adamus Implantmed Sp. z o. o.	<b>Kwiecińska-Piróg J</b> , Prażyńska M, Skowron K, Gospodarek-Komkowska E
R11	TRIBO Sp. z o. o. , Nowa Wieś Wielka (2019-2020)	Ocena skuteczności przeciwdrobnoustrojowej modułu oczyszczającego powietrze przeznaczonego do montażu w szafie do przechowywania leków wobec drobnoustrojów rozpylonych w powietrzu ( <b>R11_1</b> ) i naniesionych na powierzchnie opakowań leków ( <b>R11_2</b> ); Ocena zmian liczby bakterii tlenowych i względnie beztlenowych oraz grzybów drożdżoidalnych (po wstępnej kontaminacji) w powietrzu oraz na powierzchni opakowań leków podczas ich przechowywania w finalnej wersji „Szafy o przechowywania leków” typ SK52200 i typ LS 52000 (kod GMDN 10535) wyposażonej w lampę ActivPure RCI PCO Cell 5 for Induct 750 ( <b>R11_3</b> )	<b>Kwiecińska-Piróg J</b> , Skowron K, Wiktorczyk N, Gospodarek-Komkowska E
R12	Bacteromic Sp. z o. o., Warszawa (2021)	BacterOmic – walidacja systemu automatycznego oceny antybiotykowrażliwości bakterii	Gospodarek-Komkowska E, Zalas-Więcek P, <b>Kwiecińska-Piróg J</b> , Budzyńska A, Depka D, Przekwas J, Napiórkowska M
R13	Spółką Inżynierów SIM Sp. z o. o., Lublin (2022)	Usługa specjalistyczna obejmująca badania mikrobiologiczne i prace przygotowawcze niezbędne do stworzenia biblioteki widm wskazanych przez Zamawiającego szczepów patogenów alarmowych w celu skonstruowania przez Zamawiającego urządzenia do identyfikacji drobnoustrojów	Skowron K, Gospodarek-Komkowska E, <b>Kwiecińska-Piróg J</b> , Grudlewska-Buda K, Wiktorczyk-Kapischke N
R14	InnoTech4Life sp. z o.o., Warszawa (2022)	Ocena wpływu technologii promieniowej jonizacji katalitycznej na czystość mikrobiologiczną powietrza, wybranych powierzchni oraz ściółki w zwierzętarni	Skowron K, Gospodarek-Komkowska E, <b>Kwiecińska-Piróg J</b> , Grudlewska-Buda K, Wiktorczyk-Kapischke N, Przekwas J

## 7.6. Wynalazki oraz wzory użytkowe i przemysłowe, które uzyskały ochronę

Wynikiem współpracy z gospodarką jest, m.in. uzyskanie ochrony prawnej dla wzoru użytkowego oraz złożenie wniosków o udzielenie patentu:

1. Zgłoszenie wniosku o udzielenie patentu na wynalazek P:435375 [WIPO ST 10/C PL 435375] pn.: „Urządzenie do oceny czystości mikrobiologiczne powietrza, zwłaszcza detekcji prątków gruźlicy oraz sposób oceny czystości mikrobiologicznej powietrza” autorstwa: Skowron K, Gryń G, Nowakowski M, **Kwiecińska-Piróg J**, Grudlewska-Buda K, Wiktorczyk N, Gospodarek-Komkowska E (**CP1**)
2. Zgłoszenie wniosku o udzielenie patentu na wynalazek P:435377 [WIPO ST 10/C PL 435377] pn.: „Próbnik czystości mikrobiologicznej powietrza” (**CP2**) autorstwa: Skowron K, Gryń G, Nowakowski M, **Kwiecińska-Piróg J**, Grudlewska-Buda K, Wiktorczyk N, Gospodarek-Komkowska E
3. Zgłoszenie wzoru użytkowego nr W.127807 pn.: „Komora do oceny skuteczności mikrobiobójczej metod oczyszczania powietrza oraz dezynfekcji” autorstwa: Skowron K, Gryń G, **Kwiecińska-Piróg J**, Grudlewska K, Gospodarek-Komkowska E (**CP3**)

### 7.7. Nagrody i wyróżnienia

Za osiągnięcia w pracy zawodowej zostałam nagrodzona jednym odznaczeniem państwowym, i czterokrotnie odznaczeniami uczelnianymi. Czterokrotnie uzyskałam stypendium za wysokopunktowaną publikację naukową i trzy nagrody związane z pracą diagnosty laboratoryjnego. Są to:

- Brązowy medal za długoletnią służbę nadany przez Prezydenta Rzeczypospolitej Polskiej, 2020 rok (**N1**),
- Wyróżnienie dla nauczycieli akademickich, którzy w procesie oceny zajęć dydaktycznych (prowadzonych w roku akademickim 2015/2016) otrzymali od studentów Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu średnią ocen od 4,95 do 5,00 (2015 rok) (**N2**),
- 2021 - Zespołowa nagroda Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za osiągnięcia uzyskane w dziedzinie naukowej w 2020 roku (**N3**),
- 2022 - Zespołowa nagroda I stopnia Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za osiągnięcia uzyskane w dziedzinie naukowej w 2021 roku (**N4**),
- 2022 - Zespołowa nagroda II stopnia Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za osiągnięcia uzyskane w dziedzinie organizacyjnej w 2021 roku (**N5**),
- Stypendium JM Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za wysoko punktowaną publikację naukową: Majkut M, **Kwiecińska-Piróg J**, Wszelaczyńska E, Pobereżny J, Gospodarek-Komkowska E, Wojtacki K, Barczak T (2021): Antimicrobial activity of heat-treated Polish honeys. Food Chem 343: 1-6; IF 9,231 MEiN 200 (**N6**),
- Stypendium JM Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za wysoko punktowaną publikację naukową: Wiktorczyk-Kapischke N, Grudlewska-Buda K, Wałęcka-Zacharska E, **Kwiecińska-Piróg J**, Radtke L, Gospodarek-Komkowska E, Skowron K (2021): SARS-CoV-2 in the



environment: non-droplet spreading routes. *Sci Tot Environ* 770, 145260: 1-20; IF 10,753, MEiN 200 (N7),

- Stypendium JM Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za wysoko punktowaną publikację naukową: Grudlewska-Buda K, Wiktorczyk-Kapischke N, Wałęcka-Zacharska E, **Kwiecińska-Piróg J**, Buszko K, Leis K, Juszczuk K, Gospodarek-Komkowska E, Skowron K (2021): SARS-CoV-2—morphology, transmission and diagnosis during pandemic, review with element of meta-analysis. *J Clin Med* 3; 10 (9): 1962; IF 4,964, MEiN 140 (N8),
- Stypendium za wysoko punktowaną publikację naukową: **Kwiecińska-Piróg J**, Przekwas J, Kraszewska Z, Sękowska A, Brodzka S, Wiktorczyk-Kapischke N, Grudlewska-Buda K, Wałęcka-Zacharska E, Zacharski M, Mańkowska-Cyl A, Gospodarek-Komkowska E, Skowron K (2021): The differences in the level of anti-SARS-CoV-2 antibodies after mRNA vaccine between convalescent and non-previously infected people disappear after second dose – study in healthcare workers group in Poland. *Vaccines*, 9: 1-15; IF 4,961, MEiN 140 (N9),
- „Dyplom za wzorową pracę” Krajowej Rady Diagnostów Laboratoryjnych (N10), 2021,
- Nagroda Dyrektora Szpitala Uniwersyteckiego nr 1 im. dr. Antoniego Jurasza w Bydgoszczy za wzorowe wypełnianie obowiązków pracowniczych, przejawianie inicjatywy w pracy i podnoszenie jej wydajności i jakości w 2016 roku (2017 rok) (N11),
- Nagroda Dyrektora Szpitala Uniwersyteckiego nr 1 im. dr. Antoniego Jurasza w Bydgoszczy za szczególne zaangażowanie w diagnostykę SARS-CoV-2 podczas pandemii (2020 rok) (N12).

## 7.8. Informacje naukometryczne

Researcher ID: G-9159-2014

ORCID: 0000-0003-1476-3263

		Liczba publikacji z IF	Wartość IF	Liczba publikacji z punktami MEiN	Liczba punktów MEiN
	Publikacje pełnotekstowe	42	130,226	54	2673
	Publikacje pełnotekstowe jako pierwszy autor	10	22,417	13	447
Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk medycznych	Publikacje pełnotekstowe	7	0,145	7	46
	Publikacje pełnotekstowe jako pierwszy autor	1	0,145	2	22
Po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych	Publikacje pełnotekstowe	35	130,081	47	2627
	Publikacje pełnotekstowe jako pierwszy autor	9	22,272	11	425

## INFORMACJE DODATKOWE

- Liczba cytowań według Web of Science: 222 (bez autocytoowań: 207)
- Liczba cytowań według Scopus: 245 (bez autocytoowań: 230)
- Index Hirscha według Scopus: 9