



**Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej  
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie**

ul. W. Chodźki 1, 20-093 Lublin  
Kierownik: dr hab. n. med. Alina M. Olender  
tel./fax: (81) 44-86-400, e-mail: mikrobiologia.lekarska@umlub.pl

---

Lublin 12.05.2017

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr anal. med. Magdaleny Ratajczak**

pt. „Charakterystyka mikroorganizmów izolowanych ze środowiska farmaceutycznego  
oraz ocena ich zdolności do tworzenia biofilmu”

wykonanej w Katedrze i Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii Farmaceutycznej

Wydziału Farmaceutycznego

Uniwersytetu Medycznego im Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

pod kierunkiem prof. dr hab. n. farm. Marzeny Gajęckiej

W dobie szybkiego rozwoju przemysłu farmaceutycznego, który ma ścisły związek z rozwojem medycyny i poszukiwaniem nowych, bardziej skutecznych leków o wysokich efektach terapeutycznych, powstaje również konieczność zapewnienia wysokiej jakości uzyskiwanych produktów farmaceutycznych. W związku z tym, kluczowe staje się ich bezpieczeństwo pod względem składu, właściwości farmakologicznych jak również czystości mikrobiologicznej. Ten ważny mikrobiologiczny aspekt bezpieczeństwa leków wiąże się z pozbawieniem produktów farmaceutycznych drobnoustrojów, które ze względu na ich ilość i rodzaj mogłyby stać się dodatkowym zagrożeniem dla zdrowia pacjenta. Konieczność uzyskania wysokiego poziomu czystości mikrobiologicznej środowiska podczas produkcji farmaceutycznej jest związane z utrzymaniem wysokich standardów czystości prowadzonych procesów technologicznych, urządzeń produkcyjnych, czystości pomieszczeń, powierzchni sprzętów oraz eliminacji przenoszenia drobnoustrojów przez personel uczestniczący w produkcji. Obserwowany wśród bakterii, w ostatnich latach, szczególnie nasilony wzrost lekooporności na środki przeciwbakteryjne stwarza realne zagrożenie pojawienia się tego

typu szczepów również podczas procesów wytwarzania środków farmaceutycznych. Spośród drobnoustrojów, które stanowią poważny problem epidemiologiczny, ze względu na bardzo dobrą adaptację do środowiska z jednocześnie wysoką wirulencją wobec organizmu człowieka są pałeczki Gram-ujemne, z których największe znaczenie mają gatunki z rodzaju *Pseudomonas*. Najważniejszy z nich – *Pseudomonas aeruginosa* może być przyczyną poważnych zakażeń szpitalnych o różnej lokalizacji, często związanych z obecnością wytworzonego biofilmu na sztucznych powierzchniach cewników czy endoprotez. Zdolność do tworzenia biofilmu wiąże się ze zmianą metabolizmu bakterii, innej ekspresji fenotypowej materiału genetycznego i specyficznego zjawisko Quorum Sensing oraz wielokrotnie większej niż w przypadku postaci planktonicznej, oporności na środki przeciwbakteryjne. Szczepy te dysponują często również większą pulą czynników wirulencji, które mają ogromne znaczenie w przebiegu zakażenia. Ze względu na łatwe pozyskiwanie genów kodujących różne mechanizmy oporności na leki przeciwbakteryjne, wielolekooporne szczepy *P. aeruginosa* wytwarzające karbapenemazy cynko-zależne metalo-beta-laktamazy (mechanizm MBL) są zaliczane do grupy „Alert patogenów” szpitalnych, bardzo ważnych pod względem epidemiologicznym, wywołujących poważne zakażenia szpitalne. Łatwa adaptacja szczepów *P. aeruginosa* do różnych środowisk i wytwarzanie biofilmu, powoduje, że mogą długo utrzymywać się w różnych obszarach związanych ze środowiskiem medycznym oraz produkcją środków farmaceutycznych. Analiza i monitorowanie występujących drobnoustrojów w środowisku związanym z produkcją farmaceutyczną, ich cech wirulencji, wytwarzanie biofilmu i jego podatność na preparaty dezynfekcyjne jest ważnym elementem badań o dużym znaczeniu epidemiologicznym, które umożliwiają ocenę ryzyka zanieczyszczenia produktów farmaceutycznych drobnoustrojami, które mogą być zagrożeniem dla chorych.

Celem przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej była charakterystyka mikroorganizmów wyizolowanych ze środowiska produkcyjnego zakładów farmaceutycznych oraz ocena zdolności do tworzenia biofilmu uzyskanych szczepów *P. aeruginosa*, identyfikacja ich genów uczestniczących w zjawisku Quorum Sensing, genów odpowiedzialnych za czynniki wirulencji oraz analiza lekooporności i skuteczności eradykacji przez preparaty dezynfekcyjne.

Recenzowana praca doktorska ma typowy układ prac eksperymentalnych i składa się z 12 rozdziałów: Wstęp, Cel pracy, Materiały, Metody badawcze, Wyniki, Dyskusja, Wnioski., Spis tabel, Spis rycin, Streszczenie w języku polskim i języku angielskim oraz Piśmiennictwo.

Autorka umieściła również na początku pracy wykaz użytych skrótów. Praca liczy 142 strony. W piśmiennictwie zostało uwzględnionych 96 pozycji literatury (jedna o niekompletnych danych bibliograficznych - str. 138). Jest to bardzo mała liczba pozycji piśmiennictwa, które autorka uwzględniła w pracy, co niestety nie wpłynęło pozytywnie. Spis został sporządzony wg systemu „harvard”.

We wstępie liczącym 23 strony Doktorantka scharakteryzowała specyfikę środowiska produkcyjnych zakładów farmaceutycznych pod względem obecności drobnoustrojów, które mogą być źródłem zanieczyszczenia końcowych produktów leczniczych. Przedstawiła etapy powstawania i funkcjonowanie biofilmu bakteryjnego oraz rolę Quorum Sensing. Szczególnie zwróciła uwagę na możliwości eradykacji biofilmu uwzględniając działanie różnych związków dezynfekcyjnych. We wstępie Autorka scharakteryzowała również *P. aeruginosa*, który najczęściej występuje w zakładach farmaceutycznych oraz jego wrażliwość na antybiotyki. Na stronie 31 przedstawiła naturalną oporność na leki przeciwbakteryjne uwzględniając chinolony. W związku z tym mam pytanie: jaki jest naturalny mechanizm oporności na chinolony *P. aeruginosa* w kontekście stosowanej terapii „przeciwseudomonasowej” fluorochinolonami i badanej w pracy lekowrażliwości na ciprofloksacynę? We wstępie zabrakło mi niestety szerszego omówienia czynników wirulencji i determinujących je genów, które Doktorantka oznaczała w doświadczalnej części pracy.

W kolejnych rozdziałach zostały przedstawione materiały badań. Autorka przez okres 24 miesięcy pobierała wymazy w trzech zakładach farmaceutycznych (A, B, C) z różnych pomieszczeń produkcyjnych. Czy w okresie prowadzonych badań można było zauważyć jakąś korelację w częstości występowania izolowanych gatunków bakterii z prowadzeniem np.: rutynowych działań dezynfekcyjnych w tych zakładach? Jest to interesujące ze względu na izolację dużej liczby szczepów. W rozdziale - Metody badawcze, zostały jasno i dokładnie przedstawione zastosowane metody, co wskazuje na dobre przygotowanie praktyczne i to zarówno w zakresie znajomości metod fenotypowych jak i molekularnych. Natomiast prezentowane bardzo ładne kolorowe ryciny hodowli, testów i wyników elektroforezy wykonane przez Autorkę wg mnie powinny być umieszczone w rozdziale - Wyniki. W dalszym etapie pracy uzyskane wyniki badań, zawarte w większości w tabelach i rycinach przedstawiają kolejne etapy przeprowadzonych badań, zgodnie z założonymi szczegółowymi celami rozprawy. Doktorantka w identyfikacji szczepów na podstawie cech biochemicznych

posłużyła się metodami manualnymi (API) i automatycznymi (VITEK Compact2), co potwierdza bardzo dobre przygotowanie metodyczne Autorki. Natomiast różnorodność stosowanych zestawów cech biochemicznych wobec izolowanych pałeczek Gram-ujemnych, które odgrywają kluczową rolę w badaniach, niestety utrudnia uzyskanie jednolitych korelacji co do charakterystyki fenotypów biochemicznych szczepów. Sądzę, że w przyszłości w przygotowywanej pracy do druku, uwzględnienie takich korelacji mogłoby stanowić ciekawe uzupełnienie charakterystyki szczepów. W dalszej części pracy, Doktorantka skupiła się na izolowanych 46 szczepach *P. aeruginosa*, które faktycznie odniosły kluczową rolę w badaniach. Silne wytwarzanie biofilmu, potwierdzało występowanie wysokiego odsetka wykrytych genów biorących udział w Quorum Sensing – 89% posiadało gen *lasR*, u 80,4% szczepów obecne były geny *rhlI* oraz *rhlR*. Natomiast obecność genów determinujących wybrane czynniki wirulencji wykazało większe zróżnicowanie w występowaniu u badanych szczepów *P. aeruginosa*. Tabela 18 przedstawia zestawienie uzyskanych wyników, które bardzo dobrze scharakteryzowały na bazie badań fenotypowych i genetycznych, analizowane przez Doktorantkę cechy biofilmu i wirulencji szczepów dominującego gatunku. Kolejne wyniki badań, dotyczące oznaczania lekowrażliwości *P. aeruginosa*, sądzą, że byłyby bardziej przejrzyste gdyby Autorka połączyła tabelę 20 i 21. Interpretacja wyników została przeprowadzona na podstawie obowiązujących w Polsce rekomendacji EUCAST, ale Doktorantka nie podała z którego roku? Nie uwzględniła też tego źródła w spisie piśmiennictwa. Drobne pomyłki (w tabeli 21, uwzględnienie szczepu PA-45, który chyba jest *Klebsilla pneumoniae*?, natomiast w tabeli 22 brak szczepu PA-35?), nie mają znaczenia w końcowych wnioskach pracy.

Dyskusja zawiera analizę uzyskanych wyników w kontekście wykorzystanych przez Autorkę danych z piśmiennictwa z uwzględnieniem kolejnych etapów przeprowadzonych analiz. Bardzo cennym aspektem wykonanych badań, wobec informacji innych autorów jest stwierdzenie, że „zdolność do tworzenia biofilmu równie często występuje u szczepów bytujących w środowisku produkcji farmaceutycznej, jak i wśród szczepów izolowanych z materiałów klinicznych”. Natomiast przytaczane dane dotyczące wytwarzania biofilmu wielogatunkowego prowokuje pytanie: czy w przeprowadzonych badaniach Doktorantka stwierdziła również występowanie biofilmu wielogatunkowego? Niesłuchanie ważną informacją ze względów epidemiologicznych, jest wykrycie dwóch szczepów (nr 38 i 59)

*P. aeruginosa* wytwarzających karbapenemazy, posiadających mechanizm oporność MBL. Powinny być podjęta radykalne działania powodujące ich eradykację. Bardzo ważne jest też, scharakteryzowanie przez Doktorantkę, działania na strukturę biofilmu i postać planktoniczną różnych środków dezynfekcyjnych ze względu na substancję czynną, co ma bezpośredni wpływ na skuteczność stosowanych procedur dezynfekcji.

Końcowe wnioski zostały odpowiednio sformułowane, aczkolwiek w punkcie 2 – właściwsze wg mnie byłoby określenie „...rezerwuarem szczepów posiadających geny oporności o znaczeniu epidemiologicznym”.

W podsumowaniu pragnę podkreślić szerokie umiejętności Doktorantki w posługiwaniu się różnymi metodami badawczymi i duży wkład pracy w wykonanie badań oraz bardzo ciekawy zakres ich przeprowadzenia. Umiejętności te potwierdza dorobek naukowy w wysoko punktowanych czasopismach naukowych. Praca została napisana poprawnie pod względem językowym i stylistycznym.

Analiza badań charakteryzujących mikroorganizmy izolowane ze środowiska farmaceutycznego oraz ocena zdolności ich przetrwania w związku z tworzeniem biofilmu, opornością na środki przeciwbakteryjne i ewentualne zagrożenie chorobotwórcze ze względu na cechy wirulencji jest bardzo ważne w poznaniu aktualnej sytuacji mikrobiologicznej zakładów farmaceutycznych produkujących leki. Badania te powinny być kontynuowane, tym bardziej, że w Polsce nie ma prowadzonych podobnych badań w tym zakresie, a izolacja przez Doktorantkę szczepów *P. aeruginosa* z mechanizmem oporności MBL jest bardzo niepokojącą informacją ze względów epidemiologicznych.

Rozprawa doktorska mgr anal. med. Magdaleny Ratajczak pt. „Charakterystyka mikroorganizmów izolowanych ze środowiska farmaceutycznego oraz ocena ich zdolności do tworzenia biofilmu” – spełnia ustawowe wymagania stawiane tego typu rozprawom. W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie mgr anal. med. Magdaleny Ratajczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK  
Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej  
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie  
  
Dr hab. i med. Alina Małgorzata Olender