

Ocena

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 Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Rozprawa doktorska podjęta przez mgr anal. med. Magdalenę Ratajczak dotyczy istotnego zagadnienia, jakim jest czystość mikrobiologiczna procesu wytwarzania produktów leczniczych. Źródłem zanieczyszczenia leków drobnoustrojami, szczególnie chorobotwórczymi dla człowieka, mogą być surowce, powietrze, woda, powierzchnie użytkowe, urządzenia produkcyjne, a także opakowania i personel. Powyższy problem stanowią drobnoustroje zdolne do tworzenia błon biologicznych, zwanych biofilmami. Ich głównym rezerwuarem w pomieszczeniach przeznaczonych do produkcji leków są powierzchnie mające kontakt z wodą, takie jak zlewy, kratki ściekowe, odpływy, stoły i urządzenia produkcyjne. Biofilmy są roznosnikami drobnoustrojów, które często są odporne na środki dezynfekcyjne, a także w wielu przypadkach odznaczają się opornością na antybiotyki i wytwarzają substancje toksyczne dla człowieka.

Celem rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Ratajczak była charakterystyka drobnoustrojów wyizolowanych ze środowiska produkcyjnego wytwórni farmaceutycznych oraz ocena ich zdolności do tworzenia biofilmu. W ramach tego przedsięwzięcia doktorantka realizowała następujące zadania badawcze:

- izolacja i identyfikacja drobnoustrojów do pozycji gatunku,
- ocena zdolności do tworzenia biofilmu,
- jakościowa identyfikacja genów uczestniczących w komunikowaniu się komórek w ramach populacji,
- określanie genów odpowiedzialnych za wytwarzanie czynników zjadliwości u szczepów *Pseudomonas aeruginosa*,
- określanie skuteczności niszczenia biofilmu za pomocą środków dezynfekcyjnych stosowanych w wytwórniach farmaceutycznych, z których pochodziły wyizolowane szczepy drobnoustrojów.

Dokonania mgr Magdaleny Ratajczak w ramach rozprawy doktorskiej są następujące:

1. Z trzech wytwórni farmaceutycznych wyizolowała ona 84 szczepy drobnoustrojów, w tym z rodzaju: *Pseudomonas* 56, *Stenotrophomonas* 4, *Aeromonas* 3, rodziny *Enterobacteriaceae*, 14 (bakterie Gram-ujemne) oraz z rodzajów: *Staphylococcus* (3) i *Micrococcus* (4) (bakterie Gram-dodatnie). A zatem szczepy bakterii Gram-ujemnych stanowiły ok. 92%, a szczepy bakterii Gram-dodatnich ok. 8% wszystkich wyizolowanych drobnoustrojów. Należy zaznaczyć, że wśród nich znajdowało się 46 szczepów *Pseudomonas aeruginosa*, co stanowiło ok. 55% całości. Warto dodać, że 72 drobnoustroje (ok. 86%) wyizolowano ze środowisk wodnych (zlewy, odpływy), a z urządzeń produkcyjnych i powierzchni roboczych wyodrębniono tylko 14 z nich (ok. 14%).
2. Wśród 84 wyizolowanych drobnoustrojów tylko 6 nie wytwarzało biofilmu (głównie ziarniaki Gram-dodatnie z rodzaju *Micrococcus* i *Staphylococcus*). Pozostałe szczepy drobnoustrojów były zdolne do wytwarzania biofilmu, w tym 57 szczepów (ok. 68%) wytwarzały biofilm bardzo aktywnie. Znamienne, że wśród szczepów charakteryzujących się dużą aktywnością w wytwarzaniu biofilmu znalazły się wszystkie izolowane szczepy *Pseudomonas aeruginosa* w liczbie 46.
3. Ustalono, że wśród 46 szczepów *Pseudomonas aeruginosa*, 44 miały geny uczestniczące w komunikowaniu się komórek w ramach populacji. Geny *lasI*, *lasR*, *rhlI* i *rhlR* występowały w ponad 84% tych szczepów.
4. Badania 46 szczepów *Pseudomonas aeruginosa* dowiodły, że spośród genów zjadliwości najwięcej szczepów zawierało geny kodujące egzotoksynę A (ok. 98%) oraz elastazę (ok. 95%). W mniejszej liczbie szczepów stwierdzono obecność genów kodujących alkaliczną proteazę i proteazę IV (ok. 40%).
5. Wyniki oznaczania wrażliwości badanych szczepów *Pseudomonas aeruginosa* na antybiotyki okazały się zaskakujące. O ile bowiem szczepy kliniczne tego drobnoustroju wykazują zwykle wysoką oporność na antybiotyki stosowane w leczeniu, to szczepy wyizolowane ze środowiska produkcji farmaceutycznej były w ponad 90% wrażliwe na takie antybiotyki, jak gentamycyna, tobramycyna, ciprofloksacyna, ceftazydym, meropenem, imipenem i tikarcyлина z kwasem klawulanowym.
6. Badania dotyczące skuteczności niszczenia biofilmu, tworzonego przez badane szczepy *Pseudomonas aeruginosa*, za pomocą środków dezynfekcyjnych

stosowanych w wytwórniach farmaceutycznych, z których te szczepy pochodziły, wykazały zróżnicowane działanie. A mianowicie środek dezynfekcyjny z etanolem zastosowany w stężeniu 0,5% niszczył ok. 65% szczepów, środek z chlorem w stężeniu 0,01% niszczył ok. 96% szczepów, a środek z kwasem nadoctowym w stężeniu 0,1% niszczył tylko ok. 48% szczepów *Pseudomonas aeruginosa* tworzących biofilm.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że wszystkie założenia rozprawy doktorskiej zostały przez mgr Magdalenę Ratajczak zrealizowane. Wykazały one, że w wytwórniach farmaceutycznych często występują szczepy drobnopustrojów zdolnych do wytwarzania biofilmu. Dotyczy to szczególnie pałeczek *Pseudomonas aeruginosa*, z których wszystkie wykazywały silną tendencję do tworzenia biofilmu. Jest to o tyle niebezpieczne, ponieważ z biofilmu uwalniają się tzw. komórki planktonowe, które za pośrednictwem wody mogą zanieczyszczać środowisko produkcji farmaceutycznej, a następnie przedostawać się do wytwarzanych tam leków.

Doktorantka dowiodła ponadto, że szczepy *Pseudomonas aeruginosa* wyposażone są w geny uczestniczące w komunikowaniu się komórek w ramach populacji, dotyczy to także biofilmu, jak również zawierają geny kodujące substancje toksyczne dla człowieka, takie jak egzotoksyna A, elastaza, alkaliczna proteaza i proteaza IV. Wykazała ona również, że szczepy *Pseudomonas aeruginosa* wyizolowane ze środowiska produkcji farmaceutycznej są wrażliwe na ogólnie stosowane antybiotyki. Okazało się też, że nie wszystkie środki dezynfekcyjne stosowane w wytwórniach farmaceutycznych skutecznie eliminują te drobnoustroje znajdujące się w postaci biofilmu.

Rozprawa doktorska mgr Magdaleny Ratajczak liczy 142 strony i ma układ typowy. Jest poprzedzona starannie opracowanym wstępem, w którym omówiono zagadnienia związane z czystością mikrobiologiczną środowiska produkcji farmaceutycznej, a także tworzeniem się biofilmu bakteryjnego i zagrożeniem dla wytwarzanych leków oraz ze sposobami jego niszczenia za pomocą środków dezynfekcyjnych. Przedstawiono także charakterystykę pałeczek z rodzaju *Pseudomonas*, w tym gatunku *Pseudomonas aeruginosa*, jako bakterii najczęściej występujących w środowisku wodnym pomieszczeń, w których wytwarza się preparaty farmaceutyczne. Metody dokładnie opisują izolację i identyfikację szczepów użytych w badaniach oraz sposoby określania ich cech biologicznych. Wyniki szczegółowo dokumentują uzyskane rezultaty badań. Dyskusja dobrze interpretuje uzyskane wyniki, a wnioski trafnie precyzują osiągnięte cele przeprowadzonych badań. Starannie

dobrane piśmiennictwo obejmuje 93 pozycje. Rozprawa zawiera ponadto streszczenie polskie i angielskie. Należy podkreślić także dobrze opracowaną szatę graficzną rozprawy.

Na zakończenie chciałbym zwrócić uwagę na niektóre sformułowania użyte w rozprawie:

1. W tytule rozprawy znalazł się termin „środowiska farmaceutycznego”, który ma określać całokształt zagadnień związanych z pomieszczeniami przeznaczonymi do wytwarzania leków. Otóż termin ten ma raczej charakter socjologiczny i określa środowisko farmaceutów, tj osób związanych z farmacją. Lepiej byłoby użyć terminu „środowisko produkcji farmaceutycznej”.
2. W kilku miejscach znajdują się terminy: „forma planktoniczna” oraz „komórki planktoniczne”. Chodzi tutaj o komórki oddzielające się od biofilmu. Poprawnymi terminami będą jednak: „forma planktonowa” i „komórki planktonowe”, tj. tworzące plankton.
3. W rozprawie użyty został termin „eradykacja”. Niekiedy jest on używany w piśmiennictwie polskim. Jeżeli jednak istnieją rodzime terminy, to powinny być one stosowane zamiast terminów angielskich. A zatem porawniej byłoby użyć terminu „zniszczenie”, a dotyczy to działania na biofilm bakteryjny środków dezynfekcyjnych.

Powyższe uwagi nie umniejszają oczywiście wartości przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej, nie mniej należy je rozważyć przed opracowaniem dalszych publikacji.

W świetle przeprowadzonej oceny jednoznacznie stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr anal. med. Magdaleny Ratajczak jest wykonana i opracowana rzetelnie. Wyraźnie zaznacza się duży wkład twórczy autorki w zakresie wykonywania badań oraz ich opracowania i interpretacji. Uzyskane przez doktorantkę wyniki badań znacznie poszerzają naszą wiedzę na temat drobnoustrojów występujących w środowisku produkcji farmaceutycznej oraz ich zdolności do tworzenia biofilmu.

W związku z powyższym uważam, że rozprawa doktorska mgr anal. med. Magdaleny Ratajczak spełnia warunki określone ustawą dotyczącą stopni i tytułów naukowych i na tej podstawie zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie jej autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Bogdan Kędzia

Dr hab. n. farm. Bogdan Kędzia, prof. nadzw.