

lek. Dariusz Sławomir Domański

**Epidemiologia zakażeń i kolonizacji
grzybami drożdżopodobnymi
w populacji pacjentów szpitalnych i pozaszpitalnych**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: prof. dr hab. n. med. Ewa Swoboda-Kopeć

Promotor pomocniczy: dr n. med. Monika Kozińska

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2023

Streszczenie

We współczesnej medycynie stale narasta skala zakażeń grzybami drożdżopodobnymi. Jest to istotny problem z uwagi na trudności w diagnostyce i leczeniu wynikające z odkrywania nowych gatunków lub kryptogatunków o specyficznych właściwościach, selekcji szczepów o obniżonej wrażliwości oraz narastającej oporności drożdżaków na dostępne leki przeciwgrzybicze. Grzyby należące do gatunku *Candida* mogą wywoływać szereg infekcji o charakterze powierzchniowym i ogólnoustrojowym. Zakażenia te, w przypadku infekcji krwi lub narządów, czy też zajęcia całych układów mogą prowadzić do wysokiej śmiertelności wśród pacjentów. Leczenie takich zakażeń jest niezwykle trudne i nie zawsze przynosi pożądany efekt. Do grupy pacjentów szczególnie narażonych na zakażenia grzybami drożdżopodobnymi należą chorzy z niedoborami odporności, chorzy poddawani intensywnemu leczeniu lekami sterydowymi lub immunosupresantami, chorzy z rozpoznaną chorobą nowotworową, pacjenci po dużych zabiegach chirurgicznych lub ci pacjenci, u których stosuje się cewniki naczyniowe.

Postęp nauk medycznych sprawia, że leczeniu przeciwgrzybiczemu podlega coraz więcej pacjentów z ciężkimi i dotychczas nieuleczalnymi chorobami. Sytuacja taka wynika również ze stosowania szerokospektralnej antybiotykoterapii w profilaktyce i leczeniu zakażeń bakteryjnych. Zwalczanie zakażeń bakteryjnych sprzyja pojawianiu się zakażeń grzybiczych, a stosowane wówczas leczenie i profilaktyka przeciwgrzybicza istotnie wpływa na zmianę profilu gatunkowego grzybów drożdżopodobnych.

Wśród zakażeń drożdżakami dominującym gatunkiem jest *Candida albicans*, jednak obecnie coraz częściej izoluje się inne gatunki z grupy *Candida* spp., które łącznie są klasyfikowane jako gatunki non-*albicans* *Candida*. Pomimo istnienia ponad 200 różnych gatunków w grupie *Candida* spp. istotne znaczenie kliniczne posiada 5 z nich. Są to: *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* czy *C. lusitaniae*.

Analiza zakażeń grzybami drożdżopodobnymi, z precyzyjną identyfikacją patogenów i określeniem ich lekowrażliwości, określeniem wywoływanych zakażeń, określeniem grup pacjentów, których te zakażenia dotyczą oraz rodzaju placówek medycznych prowadzących terapię jest ważnym krokiem w ustaleniu sposobów zapobiegania i leczenia infekcji tymi patogenami. Nowoczesna diagnostyka oparta o metody biologii molekularnej i nieustający proces poszukiwania nowych leków

przeciwgrzybiczych daje nadzieję na skuteczne nadążanie za stale ewoluującymi patogenami.

Cele pracy

1. Analiza występowania zakażeń grzybami drożdżopodobnymi w lecznictwie szpitalnym i ambulatoryjnym oraz w badaniach nosicielstwa/kolonizacji.
2. Charakterystyka fenotypowa najliczniej reprezentowanego w prowadzonych badaniach, izolatu gatunku grzybów drożdżopodobnych z grupy *non-albicans Candida*, z uwzględnieniem: profilu wrażliwości na leki przeciwgrzybicze, aktywności enzymatycznej izolatów.
3. Ocena wirulencji izolatów (wybranego gatunku) przez ustalenie profilu genów z rodziny proteaz aspartylowych.
4. Analiza możliwości ustalenia algorytmu postępowania w profilaktyce i terapii w odniesieniu do wybranego gatunku grzybów drożdżopodobnych.

Materialy i metody

Materiał do badań stanowiło 7548 posiewów mykologicznych wykonanych w latach 2017-2020, pochodzących od pacjentów od 3 grup: a) pacjentów hospitalizowanych (Szpital Dzieciątka Jezus w Warszawie; b) pacjentów ambulatoryjnych (Warszawa, Siedlce); c) grupy „nosicielstwo/kolonizacja” (Izba przyjęć szpitala). Badano materiał kliniczny od pacjentów, a jego rodzaj wynikał z aktualnych objawów oraz założeń i celów terapeutycznych. Do identyfikacji szczepów wykorzystano metody rutynowej diagnostyki mikrobiologicznej obejmujące hodowlę na podłożu Sabourauda (30°C/ 24-72 godz.), biochemiczną identyfikację komercyjnym testem ID32C oraz ocenę aktywności enzymatycznej testem API-ZYM. Potwierdzenie przynależności do gatunku *C. glabrata sensu stricto*, w obrębie grupy *C. glabrata sensu lato* wykonano przy użyciu metody multiplex PCR. Detekcji genów kodujących proteazy aspartylowe (YPS1-YPS11) dokonano w oparciu o standardową reakcję PCR. Ocenę lekowrażliwości dokonano przy użyciu testu Sensititre YeastOne. Wyniki lekowrażliwości interpretowano zgodnie z wytycznymi Europejskiego Komitetu ds. Oznaczania Lekowrażliwości (EUCAST) oraz Instytutu Standardów Klinicznych i Laboratoryjnych (CLSI).

Wyniki

W latach 2017 – 2020, z 7548 posiewów w kierunku mykologicznym, uzyskano 2226 wyników dodatnich (29,49%). We wszystkich trzech badanych grupach uzyskano podobny odsetek wyników dodatnich, w grupie pacjentów hospitalizowanych – 28%, w grupie pacjentów ambulatoryjnych – 26% i w grupie „nosicielstwo/kolonizacja” - 31%. Dodatkowo posiewy w grupie pacjentów hospitalizowanych i ambulatoryjnych częściej uzyskiwano od kobiet niż od mężczyzn. Najwięcej dodatnich posiewów od pacjentów hospitalizowanych uzyskano z moczu (335), dolnych dróg oddechowych (147), moczu z cewnika (110) oraz wymazów z rany (80). W grupie pacjentów ambulatoryjnych najwięcej gatunków grzybów wyizolowano z odbytu (29), spod napletka (26) oraz z dróg rodnych (24). We wszystkich badanych grupach wyizolowano w sumie 2226 grzybów drożdżopodobnych i pleśniowych. Najczęściej izolowanym drożdżakiem była *C. albicans*, stanowiąc 48,38% wszystkich wyizolowanych grzybów. Drożdżaki z grupy non-*albicans Candida* stanowiły prawie połowę wyizolowanych drożdżaków. Głównym gatunkiem non-*albicans Candida* we wszystkich analizowanych grupach była *C. glabrata*. Innymi najczęściej izolowanymi drożdżakami z tej grupy były *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* i *C. krusei*. Przy użyciu multiplex PCR potwierdzono przynależność izolatów *C. glabrata sensu lato* do gatunku *C. glabrata sensu stricto*. Izolaty *C. glabrata* pochodziły głównie od pacjentów hospitalizowanych w oddziałach Transplantologii, Intensywnej Terapii, Chirurgii Ogólnej oraz od pacjentów z grupy „nosicielstwo/kolonizacja”. Przeprowadzono analizę cech fenotypowych izolatów *C. glabrata*. Analiza lekowrażliwości wykazała, że we wszystkich badanych grupach *C. glabrata* charakteryzowała się wysoką wrażliwością na amfoterycynę B (99,4%), anidulafunginę (95,9%), mykafunginę (92,9%) oraz kaspofunginę (88,6%). *C. glabrata* wykazywała najwyższą oporność na flukonazol (23,4%). W grupie pacjentów hospitalizowanych zaobserwowano wysoki odsetek (46,7%) szczepów *C. glabrata* opornych na flukonazol. W grupie pacjentów hospitalizowanych nie zaobserwowano oporności na amfoterycynę B, mykafunginę i kaspofunginę. W grupie „nosicielstwo/kolonizacja” zaobserwowano 20% szczepów opornych na flukonazol oraz oporność na amfoterycynę B (1,1%), anidulafunginę (3,2%) oraz mykafunginę (8,4%). Zaobserwowano wysoką i średnią aktywność aryamidazy leucynowej, fosfatazy kwaśnej, esterazy i fosfohydrolazy naftolowej w obrębie wszystkich badanych szczepów *C. glabrata*. Mniejszy odsetek izolatów wykazywał także

aktywność fosfatazy zasadowej (88% szczepów) oraz aryamidazy walinowej (88% szczepów). W badanej grupie szczepów *C. glabrata* zaobserwowano wysoki odsetek delecji genów yapsynowych (91,8% - 100%), mogących świadczyć o ich zmniejszonym potencjale zjadliwości. Największy odsetek szczepów posiadał geny YPS8, YPS1, YPS3 i YPS5. Nie wykryto genu YPS4, a tylko u pojedynczych izolatów wykryto geny YPS2, YPS6 i YPS11.

Wnioski

1. Dodatnie posiewy w badanych grupach stanowiły od 28% do 31% wszystkich analizowanych posiewów.
2. Dominującym gatunkiem *Candida* spp. izolowanym we wszystkich badanych grupach była *C. albicans* z odsetkiem występowania w zakresie od 50,4 % do 57,4%, a gatunki z grupy non-*albicans Candida* stanowiły od 42,6% do 49,6%.
3. Dominującym gatunkiem w obrębie non-*albicans Candida* był gatunek *C. glabrata*, stanowiąc 55,1% wyizolowanych drożdżaków z tej grupy.
4. Wysoka i średnia aktywność enzymów: aryamidazy leucynowej, fosfatazy kwaśnej, esterazy i fosfohydrolazy naftolowej w obrębie badanych szczepów może świadczyć o wyższym potencjale wirulencji gatunku *C. glabrata sensu stricto*.
5. W badanej grupie szczepów *C. glabrata sensu stricto* zaobserwowano wysoki odsetek delecji genów yapsynowych (91,8%-100%), mogących świadczyć o ich zmniejszonym potencjale zjadliwości.
6. Izolaty *C. glabrata sensu stricto* we wszystkich badanych grupach charakteryzowała wysoka wrażliwość na poszczególne leki przeciwmykotyczne:
 - a. amfoterycynę B (99,4%),
 - b. anidulafunginę (95,9%),
 - c. mykafunginę (92,9%),
 - d. kaspofunginę (88,6%).
7. Izolaty *C. glabrata sensu stricto* wykazywały oporność na flukonazol (23,4%), a pozostałe 76.6% izolatów wykazywało wrażliwość zależną od dawki.