

*Alcazar*

*plon*

Bydgoszcz, dn. 24 maja 2023r

**Recenzja pracy na stopień  
doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie  
nauki medyczne**

**lek. Dariusza Sławomira Domańskiego**

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

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

**Promotor pomocniczy: dr n. med. Monika Kozińska**

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. 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 rozpoznąną 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 terapie 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.

Doktorant objął analizą epidemiologię zakażeń i kolonizacji grzybami drożdżopodobnymi w populacji pacjentów szpitalnych i pozaszpitalnych.

Recenzowana praca zawarta jest na 165 stronach maszynopisu i ma układ standardowy, składa się z słów kluczowych, spisu tabel i rycin, wykazu stosowanych skrótów, streszczeń w języku polskim i angielskim wstępu, celów, materiału i metod, wyników, dyskusji, wniosków, piśmiennictwa oraz załączonej opinii stosownej komisji bioetycznej. Układ i proporcje pracy są prawidłowe, poza niewielkim poszerzeniem części wstępu i dyskusji.

Pierwsze 31 stron to wstęp zawierający rozdziały obejmujące problematykę systematyki grzybów z rodzaju *Candida*, występowanie fizjologiczne grzybów drożdżopodobnych, epidemiologię zakażeń grzybiczych, opis zakażenia wywołanego przez grzyby drożdżopodobne, przyczyny zakażeń oraz czynniki wirulencji grzybów drożdżopodobnych a w nich zmienność morfologiczną, adhezję i adherencję, sekrecję enzymów zewnątrzkomórkowych oraz wytwarzanie biofilmu. Dalej doktorant przedstawił obszernie aspekty diagnostyczne w identyfikacji gatunków *Candida* oraz aspekty terapeutyczne związane z leczeniem zakażeń o etiologii *Candida*

Doktorant w sposób prawidłowy wysnuł cele badania. Wyszczególnił je trzy:

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:
  - a. profilu wrażliwości na leki przeciwgrzybicze,
  - b. 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.

W dalszej części doktorant przedstawia materiał, metodologię i opis zastosowanych metod badawczych.

Badania w kierunku wykrycia grzybów drożdżopodobnych lek. Dariusz Sławomir Domański wykonał wśród trzech grup pacjentów tj.: pacjentów leczonych szpitalnie (pacjenci hospitalizowani), pacjentów leczonych ambulatoryjnie (pacjenci ambulatoryjni) oraz w ramach badań profilaktycznych wśród pacjentów przyjmowanych na oddziały szpitalne - grupa pacjentów „nosicielstwo/kolonizacja”.

Do grupy pacjentów hospitalizowanych należeli pacjenci leczenia z powodu istniejących chorób poszczególnych układów lub narządów w Szpitalu Klinicznym Dzieciątka Jezus Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (SKDJ WUM). Do grupy pacjentów lecznictwa otwartego należeli pacjenci objęci opieką medyczną w poradniach specjalistycznych SKDJ WUM oraz poradniach specjalistycznych lub poradni lekarza rodzinnego w Siedlcach.

Liczba badań mikrobiologicznych wykonana w grupie pacjentów hospitalizowanych to 3529. Do grupy pacjentów ambulatoryjnych należeli pacjenci zgłaszający się z różnymi dolegliwościami układowymi lub narządowymi, u których pobrano materiał do badań na zasadzie pogłębienia diagnostyki. Liczba badań mykologicznych wykonana w tej grupie to 465.

W grupie osób należących do tzw. grupy pacjentów “nosicielstwo/kolonizacja” znalazły się o osoby przyjmowane do szpitala, od których, w ramach badań profilaktycznych pobierano kał lub wymazy z odbytnicy w kierunku nosicielstwa patogenów alarmowych. Badania te oceniały również kolonizację różnymi gatunkami grzybów. Liczba badań mikrobiologicznych wykonana w tej grupie to 3554.

Wszystkie objęte niniejszą pracą badania przeprowadzono na przestrzeni trzech lat (2017-2020). W ramach niniejszej pracy wykonano 7548 badań w kierunku grzybów w grupie 6664 pacjentów.

W rozdziale 3, dotyczącym metod doktorant opisał wszystkie procedury zastosowane w dysertacji. Szczegółowo doktorant przedstawił charakterystykę wykonywanych badań - przedmiot i miejsce, opis grup pacjentów, materiały biologiczne analizowane mykologicznie pochodzące od pacjentów, sposób pobierania i przesyłania materiału biologicznego do laboratorium mikologicznego, hodowle i identyfikacje gatunkową drobnoustrojów, opis badania technikami biologii molekularnej, badanie lekowrażliwości.

Rozdział 4 dotyczący wyników przedstawia szczegółowo charakterystykę wyhodowanych grzybów z materiałów klinicznych, analizę uzyskanych wyników identyfikacji



grzybów w badanych grupach pacjentów, charakterystykę fenotypową szczepów *Candida glabrata* z wyhodowań w grupach: pacjentów hospitalizowanych, leczonych ambulatoryjnie i badanie genów kodujących enzymy z rodziny proteaz aspartylowych wśród wyizolowanych szczepów *C. glabrata*.

Prezentacja wyników stanowi najobszerniejszą część pracy, wzbogacona jest o tabele (w liczbie 17) i ryciny (w liczbie 46).

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 arylamidazy 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 arylamidazy 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. Opisy dla rycin i tabel zgodne z ogólnie przyjętymi zasadami kwalifikacji manuskryptu do druku. Część wyników mieści się na 33 stronach manuskryptu. Proporcje ilości stron do innych części dysertacji doktorskiej lek. Lek. Dariusz Sławomir Domański wydają mi się prawidłowe. Wartością rozdziału wynikowego są wieloletnie obserwacje oraz osobiste doświadczenia doktoranta przelane prawidłowo w dysertacji.

Prawidłowo doktorant na 14 stronach opracował rozdział *Dyskusja*. Lek. Domański analizuje syntetycznie wyniki swoich badań. Uzyskane przez siebie wyniki badań dyskutuje, zestawiając je w kontrpropozycjach do osiągnięć najważniejszych badaczy z omawianego tematu. Podkreślić należy rzeczowość zestawiania kluczowych problemów, wynikających z oceny uzyskanych w rozprawie wyników z opiniami innych autorów.

Na podstawie uzyskanych wyników Autor dokonał podsumowania.

Efektom tego podsumowania Doktorant wysnuł osiem wniosków reasumującą dysertację doktorską korelujących z wcześniej zaproponowanymi celami pracy:

1. Dodatkowo 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: arylamidazy 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.

Piśmiennictwo składa się z 310 pozycji, zarówno polsko- jak i anglojęzycznych, z tego 220 z ostatnich 10 lat. Pozostałe starsze pozycje są sprzed 2012 roku, jednak niektóre z nich są milowymi krokami literatury zajmującej się tym tematem. Pozycje piśmiennictwa są prawidłowo dobrane i wszystkie przez mnie sprawdzone cytowane w tekście pracy. Piśmiennictwo ułożone jest w kolejności występowania/ System VANCOUVER (numeryczny) /w tekście co znacznie ułatwia wyszukiwanie poszczególnych pozycji. Jednak w spisie literatury dostrzegam pewne niekonsekwencje zapisowe, ponieważ we włączonej pozycjach literaturowych raz jest jeden autor et al., w innych jest kilku, wydaje się że w tej materii przygotowanie pracy do publikacji będzie wymagało dodatkowego trudu.

Manuskrypt przygotowany jest starannie, z dbałością o szczegóły graficzne i estetyczne.

Zgodnie z obowiązkiem recenzenta, muszę przedstawić swoje uwagi krytyczne dotyczące manuskryptu, a są one następujące:

Od strony edytorskiej praca jest prawie bez zarzutów poza nielicznymi drobnymi błędami edytorskimi.

W części bibliograficznej nie do końca konsekwentnie doktorant podawał odnośniki literaturowe; (Źródła skrótów czasopism Skróty tytułów czasopism powinny być zgodne z listą skrótów Index Medicus <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>; W przygotowaniu pracy do druku warto byłoby przejrzeć jeszcze raz spis literatury uwzględniający tę uwagę.)

Przekład streszczenia na język angielski przy przygotowaniu do druku publikacji powinien być nieco lepszy językowo.

Również nie znalazłem tak typowego podrozdziału jak część statystyczna, jednak w tego typu publikacjach nie jest ona niezbędna.

Proszę aby Doktorant ustosunkowała się do powyższych uwag.

Opisane wyżej niedociągnięcia nie wpływają na pozytywną merytoryczną ocenę pracy, choć uwzględnienie uwag powinno przyczynić się do podniesienia walorów manuskryptu wysyłanego w przyszłości do czasopisma.

Podsumowując praca posiada liczne walory:

1. Olbrzymi materiał -analiza 8 tys. wyników w wielu aspektach - żmudne i wymagające skrupulatności badania

2. Bogactwo etiologiczne analizowanego materiału - różnorodność szczepów - ponad 20 wyizolowanych gatunków
3. Szerokie spojrzenie w wymiarach klinicznych i mikrobiologicznych (poradnie, oddziały, materiały, choroby, rodziny, gatunki, kryptogatunki)
4. Nowe perspektywy - punkt wyjścia do analizy zależności międzygatunkowych, predyspozycji występowania na kilkunastu oddziałach, dominacja gatunków w obrębie NAC
5. Lekarz praktyk uwrażliwiony i skoncentrowany na praktycznym wymiarze wyników
6. Adekwatne do skali istotności uwzględnienie analizy kryptogatunków
7. Wykazanie selekcji stanowiących zagrożenie kliniczne szczepów oportunistycznych
8. Szeroka ocena lekowrażliwości w ujęciu prospektywnym

Rozprawę doktorską lekarza **Dariusza Sławomira Domańskiego** oceniam bardzo wysoko. Na szczególne uznanie zasługuje metodologia oraz walory aplikacyjne uzyskanych wyników. Doktorant wykazał się umiejętnością planowania badań i ich realizacji, oraz rozwiązywania problemów naukowych. Rozprawa doktorska stanowi cenne źródło informacji, a jednocześnie wskazuje nowe aspekty, które mogą być ważnym kierunkiem badawczym Doktoranta w przyszłości. Praca stanowi wyczerpujące, staranne i oryginalne opracowanie problemu naukowego, znacząco przyczynia się do zaktualizowania wiedzy.

**Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. Dariusza Sławomira Domańskiego**

**pt. „Epidemiologia zakażeń i kolonizacji grzybami drożdżopodobnymi w populacji pacjentów szpitalnych i pozaszpitalnych.”**

została oceniona w myśl art. 179 ust.1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce ( Dz. U z 2018r poz.1669). Podsumowując wyżej wymieniona rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki ( Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz. 1669 z późn. zm.).W związku z tym, wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lek. Dariusza Sławomira Domańskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

UNIwersytet MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU  
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy  
Wydział Lekarski  
Katedra Chorób Płuc, Nowotworów i Gruźlicy  
ul. Seminaryjna 1, 85-326 Bydgoszcz  
tel. 52 325 67 82  
e-mail: kikchpluc@em.umk.pl

Kierownik  
Katedry Chorób Płuc, Nowotworów  
i Gruźlicy  
  
dr hab. Grzegorz Przybylski, prof. UMK

24 IV 2023