

akceptacja
H. J.

Ocena pracy doktorskiej lekarza Dariusza Sławomira Domańskiego

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

Praca doktorska lekarza Dariusza Sławomira Domańskiego powstała pod kierunkiem promotora głównego- prof. dr hab. n. med. Ewy Swobody-Kopeć i promotora pomocniczego dr n.med. Moniki Kozińskiej.

Doktorant zajął się ważnym problemem zdrowotnym, jakim są zakażenia wywołane przez grzyby drożdżopodobne z rodzaju Candida. Candida spp są powszechne w przyrodzie i częściej niż inne grzyby powodują choroby u ludzi. Działanie chorobotwórcze wykazuje 15 gatunków z rodzaju Candida, najczęściej C. albicans, C. glabrata, C. tropicalis, C. parapsilosis, C. krusei. Kandydoza może dotyczyć błon śluzowych jamy ustnej i gardła, przełyku, innych odcinków przewodu pokarmowego, układu moczowo płciowego. Grzyby drożdżopodobne z rodzaju Candida są patogenami oportunistycznymi, które wykorzystują postęp w medycynie i zwiększenie populacji osób o obniżonej odporności, by dostać się do krwiobiegu lub głębiej położonych tkanek. Problem zakażeń układowych narasta, ponieważ wzrasta grupa osób z ryzykiem zachorowania i coraz więcej jest okoliczności, w których drożdże mogą atakować tkanki zwykle odporne na taką inwazję. Inwazyjna kandydoza z rozsiewem krwiopochodnym jest chorobą o dużej śmiertelności. Ryzyko zgonu jest mniejsze, jeżeli zostanie podjęte właściwe leczenie.

Praca ma strukturę typową dla prac doświadczalnych w dziedzinie biologii i medycyny. Autor zawarł w rozprawie słowa kluczowe, spis rycin (46) i tabel (17), wykaz stosowanych skrótów określeń podanych w języku angielskim i polskim, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp (30 stron), cel pracy (1 strona), materiały i metody (16 stron), wyniki badań (40), dyskusję (14), wnioski (1 strona) i piśmiennictwo. Wykaz piśmiennictwa zawiera 310 pozycji uszeregowanych zgodnie z kolejnością ich cytowania w tekście pracy.

Piśmiennictwo w większości obejmuje prace z ostatnich 10 lat, w tym wiele cytowanych publikacji powstało w ostatnich 5 latach.

Autor dołączył oświadczenie Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym z dnia 11.03.2019 roku, zgodnie z którym badanie nie stanowi eksperymentu medycznego w rozumieniu art.21 ust. 1 ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodach

lekarza i lekarza dentystry (Dz.U. z 2018 r. poz. 617) i nie wymaga opinii Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym, o której mowa w art. 29 ust. 1 ww. ustawy.

We **wstępie** (dane z piśmiennictwa) Autor szczegółowo omawia systematykę grzybów z rodzaju *Candida*, epidemiologię zakażeń grzybami drożdżopodobnymi, czynniki ryzyka drożdżycy i właściwości grzybów, które warunkują rozwój zakażenia, postaci choroby, metody identyfikacji drożdżaków, leczenie zakażeń.

Postawione w rozprawie **cele** pracy, dotyczące analizy posiewów potwierdzających obecność grzybów drożdżopodobnych w materiałach klinicznych u osób z trzech różnych grup pacjentów, charakterystyki fenotypowej gatunku grzybów drożdżopodobnych z grupy *non-albicans Candida* najliczniej reprezentowanego wśród uzyskanych izolatów, z określeniem wrażliwości na leki przeciwgrzybicze, także te dotyczące oceny wirulencji izolatów, uważam za ważne. Ich realizacja przyczyni się niewątpliwie do poszerzenia wiedzy o patogenach oportunistycznych, stanowiących zagrożenie dla osób z czynnikami ryzyka. Końcowym celem pracy, możliwym do zrealizowania dzięki wynikom uzyskanym podczas realizacji celów podanych wyżej, jest propozycja algorytmu postępowania w profilaktyce i terapii w odniesieniu do wybranego przez Doktoranta gatunku grzybów drożdżopodobnych, o największym znaczeniu chorobotwórczym.

Rozdział **Materiały i Metody** nie budzi zastrzeżeń. Doktorant z dużą dokładnością omówił badane grupy pacjentów. Pierwszą grupą byli chorzy hospitalizowani, drugą pacjenci różnych poradni leczenia otwartego, trzecią- osoby oczekujące w izbie przyjęć na przyjęcie do szpitala (grupa „nosicielstwo/kolonizacja”). Badano metodami mikrobiologicznymi różne materiały kliniczne (płyny ustrojowe, wydaliny- w tym próbki kału z grupy „nosicielstwo/kolonizacja), wydzieliny w tym plwocina, fragmenty pobranych tkanek) i pochodzące ze źródła poza ich organizmami (płyny prezerwacyjne, stenty, dreny i cewniki, rurki intubacyjne i inne sztuczne materiały). Zastosowane w pracy techniki mikrobiologiczne opisane zostały przez Doktoranta z dużą dokładnością, ze zrozumieniem ich właściwości.

Materiały kliniczne zostały posiane zgodnie z procedurami rutynowej diagnostyki mikrobiologicznej. Identyfikacja gatunkowa została wykonana przy użyciu testów biochemicznych i spektrometrii mas. Wyhodowane szczepy poddano badaniom molekularnym. Techniki biologii molekularnej posłużyły do identyfikacji gatunków tworzących

C. glabrata complex i do wykrywania w nich genów czynników wirulencji. Przeprowadzono analizę lekowrażliwości C. glabrata na polieny, azole, echinokandyny (antybiotyki) i na 5-fluorocytozynę (analog nukleozydowy).

Wyniki badań opracowano starannie. Identyfikacji gatunkowej poddano grzyby wyrosłe z 2200 próbek różnorodnych materiałach klinicznych. Nie wiadomo, które izolaty pochodziły od osób chorych na jedną z postaci drożdżycy a które z materiałów klinicznych jedynie skolonizowanych przez grzyby, ale nie ma to znaczenia dla samych badań wykonanych na potrzeby ocenianej rozprawy. Badaniom lekowrażliwości poddano łącznie 547 szczepów Candida glabrata. Aktywność enzymatyczną gatunku C. glabrata badano na 25 szczepach, sprawdzając 19 enzymów. Badaniem genów kodujących enzymy z rodziny proteaz aspartylowych wykazano, że szczepy C. glabrata należą do gatunku C. glabrata sensu stricto. Wykonanie tak dużej liczby oznaczeń wymagało skrupulatności i godnego podziwu oddania pracy badawczej praktykującego lekarza, jakim jest Doktorant.

Badania wykazały bogactwo etiologiczne analizowanego materiału. Udało się wyizolować ponad 20 gatunków Candida spp. Wyniki badań Doktorant opracował drobiazgowo, posiłkując się tabelami i rycinami o dobrej kompozycji. We wszystkich badanych grupach dominującym był gatunek Candida albicans, drugie co do częstości izolowane były szczepy gatunku Candida glabrata (w grupie pacjentów ambulatoryjnych odsetek szczepów C. glabrata był znacznie mniejszy niż u pozostałych osób), należące do gatunku C. glabrata sensu stricto. Większość dodatnich posiewów uzyskano z materiałów klinicznych pobranych od kobiet. Lekiem, na które wszystkie szczepy Candida glabrata sensu stricto, niezależnie od miejsca pobrania, były odporne, jest flukonazol; w odniesieniu do MIC dla innych azoli występowały znaczne różnice między szczepami. Kilka procent szczepów wykazało oporność na echinokandyny, najmniej na anidulofunginę (4,1%). Szczepy C glabrata miały podobne wartości MIC w odniesieniu do 5- fluorocytozyny. Wszystkie badane szczepy (25) wytwarzały enzymy, którym przypisuje się znaczenie w chorobotwórczości gatunku i które wykazywały w badanej grupie dużą aktywność (100-88%) i jednocześnie duży odsetek delecji w genach kodujących enzymy yapsynowe, co może wskazywać na obniżoną zdolność przetrwania grzybów w zaatakowanych komórkach gospodarza.

Kolejny rozdział pracy, „Dyskusja”, napisany jest dobrze. Doktorant wnikliwie analizuje zmieniającą się epidemiologię zakażeń powodowanych przez drożdżaki, ze wzrastającym udziałem zakażeń wywołanych przez *C. glabrata*, zastępujących dominujące wcześniej *C. albicans*. Gatunek *C. glabrata*, co Doktorant udowodnił badaniami i wsparł danymi z piśmiennictwa, ma potencjał chorobotwórczy, tym niemniej z obniżoną zdolnością do przetrwania w zaatakowanych komórkach gospodarza. Doktorant wykazał, omawiając własne wyniki i dane z piśmiennictwa, że wobec zwiększonej zjadliwości i jednocześnie powszechnej oporności szczepów *C. glabrata* na flukonazol, możliwej oporności na echinokandyny i dużej rozpiętości wartości MIC dla pozostałych azoli, gatunek *C. glabrata* może stanowić rosnące zagrożenie dla osób o upośledzonej odporności.

Wnioski są przejrzysto sformułowane, wynikające z uzyskanych wyników i dowodzące realizacji celów pracy.

Mam kilka uwag krytycznych dotyczących rozprawy, które jednak nie umniejszają jej wartości. Doktorant kilka razy nazwał rodzaj gatunkiem. W streszczeniu (w wersji polskiej i angielskiej) pacjentom ambulatoryjnym przypisane zostały materiały do badań pobrane w grupie ‘nosicielstwo-kolonizacja’. W podrozdziale 4.1 i 4.2 Autor kilkakrotnie wyraża się nieprecyzyjnie, pisząc „liczba wyhodowanych grzybów” lub „liczba izolowanych gatunków grzybów’ odnosząc się w istocie do liczby dodatnich posiewów. Piśmiennictwo przedstawione zostało w sposób niejednorodny, odnośnie niektórych pozycji piśmiennictwa Autor podaje pełną nazwę pisma, skąd pochodzi cytowany artykuł, kiedy indziej stosuje skróty (Clinical Microbiology and Infection vs. Int J Antimicrob Agents). W niektórych tytułach cytowanych prac Autor rozpoczyna poszczególne wyrazy dużą literą (np. pozycja 222 i 233), w innych małą. Nie jest jasne, przy ilu autorach cytowanej pracy wymieniany jest tylko pierwszy autor a pozostali kwitowani skrótem et al. (np. 210, 216, 222). Zdarza się niepełne cytowanie źródeł, bez podania zakresu stron (np. pozycja 214- E343-53).

W podsumowaniu jako recenzent doceniam obfitość i różnorodność materiału zebranego przez Doktoranta i jego dociekliwe analizy właściwości grzybów drożdżopodobnych. Widzę zaangażowanie badacza i jednocześnie lekarza praktyka, który planując badania bierze pod uwagę ich użyteczność w opiece nad chorymi. Autor rozprawy wykazał, że gatunek *C. glabrata* ma własności stanowiące zagrożenie dla osób z zaburzeniami

odporności. Analiza lekowrażliwości *Candida glabrata* dokonana przez Doktoranta może pomóc lekarzom przy empirycznym wyborze terapii w przypadkach ciężkich zakażeń, wymagających szybkich działań.

Oceniam pozytywnie pracę doktorską lekarza Dariusza Sławomira Domańskiego pokazującą znajomość badanego zagadnienia. Uznaję wartość poznawczą i aplikacyjną pracy, która może przyczynić się do poprawy bezpieczeństwa chorych i stwierdzam, że spełnia wymogi art. 12 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz wymogi art. 179 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. przepisy wprowadzające ustawę Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce, stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień doktora w dyscyplinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu.

Wnoszę do Rady Naukowej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lekarza Dariusza Sławomira Domańskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK ZAKŁADU
Epidemiologii i Organizacji
Walki z Gruźlicą


Maria Korzeniewska-Kosela
Dr hab. n. med. prof. nadzw.