

Prof. nadzw. dr hab. n. med. Anna Głowacka

Łódź, dn. 30.11.2015 r.

Zakład Biologii Środowiskowej

Wydział Wojskowo-Lekarski

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Marianny Małek pt. "Zastosowanie metod molekularnych w diagnostyce grzybic inwazyjnych i analiza kliniczno-epidemiologiczna zakażeń grzybiczych u osób hospitalizowanych".

Praca wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Rozpoznanie grzybicy inwazyjnej jest procesem trudnym opartym na analizie czynników predysponujących do wystąpienia zakażeń, ocenie klinicznej dokonanej na podstawie występujących objawów, badania przedmiotowego, wyników technik obrazowych oraz badań laboratoryjnych.

Dlatego tematykę badawczą w przedłożonej mnie do oceny rozprawie doktorskiej Pani mgr Marianny Małek uważam za niezwykle ważną i aktualną, ponieważ dotyczy:

1. udoskonalenia metodologii badań diagnostycznych grzybic inwazyjnych, których częstość występowania na kuli ziemskiej systematycznie wzrasta
2. obserwowanych zmian epidemiologicznych grzybic, które powstały w następstwie dynamicznego rozwoju medycyny związanego z wprowadzeniem nowoczesnych metod diagnostycznych i leczenia
3. konieczności monitorowania epidemiologii zakażeń grzybiczych u osób hospitalizowanych

Duże znaczenie dla leczenia oraz badań epidemiologicznych zakażeń grzybiczych ma właściwa identyfikacja czynników etiologicznych, dlatego kluczowym zadaniem jest włączenie do diagnostyki mikologicznej metod nieobarczonych ryzykiem błędu. Z powyższych względów problematyka badawcza pracy doktorskiej Pani mgr Marianny Małek wychodzi naprzeciw potrzebom praktyki

klinicznej w obszarze badań diagnostycznych i epidemiologicznych grzybic inwazyjnych. W szerszym kontekście praca ta stanowi także wkład w rozwój nowoczesnej diagnostyki mikologicznej.

Rozprawa doktorska mgr Marianny Małek stanowi jednotomowe opracowanie liczące 206 ponumerowanych stron tekstu wraz ze streszczeniem pracy w języku polskim, angielskim i wykazem skrótów zastosowanych w tekście. Piśmiennictwo pracy obejmuje 211 pozycji zawartych na 18 stronach, najczęściej obcojęzycznych w większości z lat 2004 – 2015. Dokumentacja graficzna rozprawy zawiera 38 rycin (w tym: 4 fotografie, 13 wykresów, 2 schematy, 17 elektroforegramów, 2 dendrogramy) oraz 43 tabele. Umieszczenie rycin i tabel w tekście ułatwia analizę i ocenę pracy. Całość dokumentacji została przygotowana starannie i czytelnie. Na odrębną pochwałę zasługują bardzo wyraziste elektroforegramy. Zaletą pracy jest również zrozumiały język oraz logiczny układ treści, co sprawia, że jest to praca przystępna w odbiorze.

Wstęp. We wstępie pracy zawartym na 39 stronach maszynopisu Autorka przedstawiła przegląd piśmiennictwa dotyczącego problematyki pracy (między innymi charakterystyki zakażeń grzybiczych, diagnostyki inwazyjnych zakażeń grzybiczych, metod molekularnych stosowanych w diagnostyce grzybic głębokich oraz epidemiologii grzybic inwazyjnych).

Cele badawcze. W drugim rozdziale Doktorantka sformułowała cele pracy badawczej:

1. ocena występowania kolonizacji/zakażeń grzybiczych u pacjentów hospitalizowanych w latach 2008-2012 w czterech oddziałach Szpitala Specjalistycznego im. Ludwika Rydygiera w Krakowie: OAiIT (Oddział Anestezjologii i Intensywnej Terapii), OLO (Oddział Leczenia Oparzeń), OChW (Oddział Chorób Wewnętrznych) i OChSz-T (Oddział Chirurgii Szcękowo-Twarzowej).

2. ustalenie pokrewieństwa genetycznego między szczepami *Candida albicans* a *Candida glabrata* izolowanych z aspiratów tchawiczych, moczu oraz krwi od pacjentów hospitalizowanych w OAiIT przy użyciu metody RAPD PCR.

3. porównanie wyników, analiza konwencjonalnych metod mikologicznych i badania histopatologicznego wykonanych u pacjentów OChSz-T podejrzanych o aspergilozę zatok przynosowych.

4. opracowanie metody PCR skutecznej do wykrycia DNA u grzybów z rodzaju *Aspergillus* bezpośrednio w pobranych śródoperacyjnie biopsjach śluzówki zatok szczękowych u pacjentów diagnozowanych w kierunku aspergilozy.

5. ocena opracowanej metody PCR pod kątem jej zastosowania w diagnostyce aspergilozy zatok w oparciu o analizę porównawczą uzyskanych wyników z wynikami badań mikologicznych i histopatologicznych.

Materiał i metody. W rozdziale tym Doktorantka szczegółowo opisuje strukturę Szpitala Specjalistycznego im. Ludwika Rydygiera w Krakowie, procedury badania mikologicznego oraz

- metody molekularne stosowane w diagnostyce grzybic głębokich. Ocenę występowania kolonizacji/zakażeń grzybiczych dokonano u 1348 hospitalizowanych pacjentów w oparciu o wyniki badań mikologicznych w ramach rutynowej diagnostyki.

Do badań dotyczących pokrewieństwa genetycznego z pobranych materiałów klinicznych wyselekcjonowano 62 szczepy *Candida albicans* i 40 szczepów *Candida glabrata* pod kątem klasyfikacji gatunkowej metodami molekularnymi, a następnie przeprowadzono ich identyfikację metodą RAPD PCR. Biopaty śluzówki zatok szczękowych (69) poddano procedurze izolacji DNA, a następnie amplifikacji metodą nested PCR.

Wyniki badań. Autorka pracy wykazała, że:

- najczęstszym czynnikiem kolonizacji/zakażeń grzybiczych u hospitalizowanych pacjentów na wszystkich Oddziałach Szpitala była *Candida albicans* 52,6% - OA i IT, 53,5 % - OChW, 51,6% - OLO, 57,9% - OChSz-T, a w dalszej kolejności *Candida glabrata* 16,2% - OA i IT, 20,5% - OChW, 15,8% - OLO, 7,9% - OChSz-T

- u chorych z Oddziału Anestezjologii i Intensywnej Terapii (OA i IT) wszystkie izolaty *C. albicans*, i większość szczepów *C. glabrata* miały endogenne pochodzenie

- zastosowana w typowaniu molekularnym metoda RAPD PCR charakteryzowała się wysoką siłą dyskryminacji w różnicowaniu szczepów z rodzaju *Candida*

- przeprowadzona analiza porównawcza wyników uzyskanych metodą PCR oraz badania histopatologicznego stosowanego w diagnostyce aspergilozy zatok potwierdziła wysoką skuteczność w 90% metody PCR w wykrywaniu aspergilozy

Dobrze udokumentowane wyniki badań w postaci tabel, wykresów i rycin z odpowiednimi parametrami analizy statystycznej zwalniają recenzenta od szczegółowego ich omawiania.

Dyskusja. W dyskusji zawartej na 18 stronach maszynopisu Doktorantka omawia swoje wyniki w zakresie poszczególnych zagadnień badawczych postawionych w celu pracy i konfrontuje je z badaniami innych autorów zarówno krajowych jak i zagranicznych, co znacznie wzbogaca rozprawę i świadczy o bardzo dobrej znajomości literatury przedmiotu przez Autorkę rozprawy.

Wnioski. Doktorantka przedstawiła 10 wniosków sformułowanych w oparciu o wyniki przeprowadzonych badań i mieszczące się w ramach tematu pracy.

Za najważniejsze uważam stwierdzenia zawarte we wnioskach: 5, 7, 9 i 10, które wyraźnie odzwierciedlają uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań własnych. Pozostałe wnioski należałoby przedstawić w sposób bardziej syntetyczny, ponieważ przedstawione w aktualnej formie stanowią raczej wyniki badań, a nie wnioski.

Przy czytaniu pracy zauważyłam drobne nieścisłości, np. str 97. Autorka podaje w tekście ilość pacjentów 603 z podziałem na płeć (224 kobiety i 379 mężczyzn) bez uwzględnienia tego podziału w tabeli.

Poczynione przeze mnie uwagi nie mają w żadnym wypadku wpływu na treść merytoryczną przedstawionej rozprawy doktorskiej. Uważam, że praca ta wnosi do nauki i praktyki klinicznej informacje o możliwości diagnozowania trudno rozpoznawalnych zakażeń zatok szczękowych wywołanych przez grzyby z rodzaju *Aspergillus*, wykorzystując metody diagnostyczne oparte na analizie molekularnej.

Rozprawa doktorska mgr Marianny Małek jest bardzo obszerna, Autorka poświęciła jej dużo pracy, a jej cel zgodnie z założeniami został osiągnięty. Biorąc pod uwagę jej charakter, bardzo dużą wartość merytoryczną i użyteczną stwierdzam, że praca spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim stosownie do ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki.

Opierając się na zawartych w tej recenzji przesłankach mam zaszczyt zwrócić się do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie z wnioskiem o przyjęcie rozprawy pt. **"Zastosowanie metod molekularnych w diagnostyce grzybic inwazyjnych i analiza kliniczno-epidemiologiczna zakażeń grzybiczych u osób hospitalizowanych"** jako rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Marianny Małek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Zakładu Biologii Środowiskowej
90-643 Łódź, ul. Żeligowskiego 7/9

Anna Głowacka
dr hab. n. med. prof. nadzw.
Anna Głowacka