

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani Magister Marianny Malek  
zatytułowanej**

**„Zastosowanie metod molekularnych w diagnostyce grzybic  
inwazyjnych i analiza kliniczno-epidemiologiczna zakażeń grzybiczych u osób  
hospitalizowanych”**



UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM  
MEDICUM

W ostatnim dziesięcioleciu na całym świecie obserwowany jest ciągły wzrost wykrywanych zakażeń bakteryjnych jak i grzybiczych u pacjentów hospitalizowanych. Zakażenia te dotyczą głównie pacjentów w ciężkim stanie i w dużej części przyczyniają się do pogorszenia ogólnego ich stanu zdrowia, przedłużenia hospitalizacji z powodu powikłań a niejednokrotnie nawet do śmierci. Dodatkowo, coraz więcej bakterii i grzybów, będących przyczyną tych zakażeń, wykazuje oporności na antybiotyki i leki przeciwgrzybicze. W przypadku zakażeń szpitalnych szczepy odporne na leki są wykrywane znacznie częściej niż w przypadku chorych nie hospitalizowanych. Dlatego też, precyzyjna diagnostyka rodzaju zakażenia oraz wiarygodne określenie źródła pochodzenia drobnoustrojów do tego zakażenia prowadzących ma kluczowe znaczenie w podjęciu prawidłowej terapii chorego. W burzliwie przebiegających chorobach zakaźnych, często o powodzeniu leczenia decydują pierwsze doby lub wręcz pierwsze godziny choroby.

Diagnostyka chorób zakaźnych w ostatnich latach została wzbogacona o nowe narzędzia biologii molekularnej. Ta dziedzina, do niedawna zarezerwowana tylko dla nauk podstawowych, w ostatnich latach dostarczyła wielu niezwykle precyzyjnych i wydajnych technik diagnostycznych. W chwili obecnej trudno sobie wyobrazić prowadzenie terapii celowanej, tak w onkologii jak i w innych dziedzinach medycyny bez diagnostyki molekularnej. Opracowanie nowych technik diagnostyki molekularnej ma szczególne znaczenie tam, gdzie dotychczas stosowane, nawet bardzo dobre i czułe, metody pochłaniają zbyt wiele czasu. Diagnostyka mikrobiologiczna i mikologiczna w chwili obecnej wciąż wykorzystuje bezpośrednie hodowle bakterii i grzybów oraz ocenę histopatologiczną preparatów w celu identyfikacji patogenu, co wielokrotnie jest jedynym sposobem uzyskania wiarygodnej informacji o przyczynie choroby. Jednakże, niektórych analiz, jak chociażby badania pokrewieństwa genetycznego szczepów izolowanych od pacjentów szpitalnych czy szybkiego wykrywania obecności śladowych ilości komórek grzybów lub bakterii w preparatach

Wydział Nauk o Zdrowiu

Instytut Fizjoterapii

Zakład Fizjologii Medycznej

ul. Michałowskiego 12

PL 31-126 Kraków

tel. +48(12) 634 33 97 w.33

fax +48(12) 634 33 97 w. 44



klinicznych, nie sposób przeprowadzić inaczej niż wykorzystując techniki molekularne.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani Magister Marianny Małek zatytułowana „Zastosowanie metod molekularnych w diagnostyce grzybic inwazyjnych i analiza kliniczno-epidemiologiczna zakażeń grzybiczych u osób hospitalizowanych” przygotowana pod opieką Pani Profesor Alicji Budak w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej na Wydziale Farmacji Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego dotyczy obu wspomnianych powyżej zagadnień. Podjęte przez autorkę tematy łączy ściśle wspólny mianownik w postaci metod molekularnych stosowanych w analizie zakażeń pacjentów hospitalizowanych.

Przedłożona do recenzji dwustusześciostronicowa rozprawa doktorska magister Marianny Małek zawiera obszerny czterdziestotrzystronicowy *WSTĘP*, w którym autorka przedstawia wszystkie aspekty dotyczące tematyki samej pracy, szczegółowo charakteryzując rodzaje zakażeń grzybiczych, „tradycyjne” i molekularne metody diagnostyczne stosowane w ich ocenie oraz epidemiologię grzybic.

Jasno i ambitnie określony w pięciu punktach *CEL BADAŃ* poprzedza niezwykle szczegółowy i opracowany ze starannością trzydziestoośmiostronicowy rozdział *MATERIALY I METODY*, w którym autorka przedstawiła pełny opis procedur badania mikologicznego materiału klinicznego. Fachowo przedstawiono technikę izolacji i pomiaru wyizolowanego DNA, wykonywania rozcieńczeń, przygotowania reakcji PCR. Ponadto znalazły się tutaj protokoły postępowania diagnostycznego w celu określenia pokrewieństw genetycznych pomiędzy badanymi szczepami grzybów *Candida*. Dodatkowo autorka przedstawiła opracowaną przez siebie szybką metodę wykrywania DNA grzybów z rodzaju *Aspergillus* w biopsjach śluzówki zatok szczękowych pobranych od zakwalifikowanych do badania pacjentów. Autorka przedstawiła pomysłowy sposób na przeprowadzenie pełnej kontroli czułości, swoistości i skuteczności zastosowanej metody wykorzystującej technikę nested-PCR. Ponadto, opisane zostały próby zastosowania techniki Real-time PCR, które jednakowoż zakończyły się niepowodzeniem, co prawdopodobnie spowodowane było trudnością w zaprojektowaniu odpowiednio selekcyjnych starterów.



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM  
MEDICUM

Wydział Nauk o Zdrowiu

Instytut Fizjoterapii

Zakład Fizjologii Medycznej

ul. Michałowskiego 12

PL 31-126 Kraków

tel. +48(12) 634 33 97 w.33

fax +48(12) 634 33 97 w. 44



Rozdział *WYNIKI* został podzielony na części zawierające:

- analizy epidemiologicznej zakażeń grzybiczych;
- określenia pokrewieństwa genetycznego szczepów *Candida albicans* i *Candida glabrata*;
- opracowania metody wykrywającej DNA grzybów z rodzaju *Aspergillus* w materiale klinicznym.

Zastosowany podział tekstu tego rozległego rozdziału ułatwia zapoznanie się z bardzo dużą ilością danych liczbowych i wyliczonych wartości procentowych analizujących częstość występowania zakażeń grzybiczych u pacjentów hospitalizowanych w Szpitalu Specjalistycznym im. Ludwika Rydygiera w Krakowie na:

1. Oddziale Anestezjologii i Intensywnej Terapii (OAiT);
2. Oddziale Chorób Wewnętrznych (OChW);
3. Oddziale Leczenia Oparzeń (OLO);
4. Oddziale Chirurgii Szczękowo-Twarzowej.

Autorka większość danych liczbowych umieściła w 43 tabelach, a 38 rycin ułatwiają analizę rozdziału. Dane dotyczą wyników ilościowych badania mikologicznego materiału klinicznego jakim w zależności od oddziału były:

- aspiraty tchawicze;
- plwocina;
- krew;
- ropa;
- wymaz;
- mocz;
- kał.

Przeprowadzone porównania ilości wykonanych badań mikologicznych w latach 2008-2012 zilustrowano kolorowymi grafami, a wyniki analizy PCR zdjęciami żeli. Na szczególną uwagę zasługuje przeprowadzona przez autorkę analiza pokrewieństwa genetycznego grzybów *Candida albicans* i *Candida glabrata*. Stosując technikę RAPD PCR z wykorzystaniem aż pięciu różnych starterów przeprowadzono typowanie 62 szczepów *Candida albicans* i 40 szczepów *Candida glabrata*. Podsumowanie przedstawiono w postaci dendrogramów powstałych po analizie statystycznej.

Ostatnia część rozdziału *WYNIKI*, dotyczy opracowania metody wykrywającej DNA grzybów z rodzaju *Aspergillus* w materiale klinicznym.



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM  
MEDICUM

Wydział Nauk o Zdrowiu

Instytut Fizjoterapii

Zakład Fizjologii Medycznej

ul. Michałowskiego 12

PL 31-126 Kraków

tel. +48(12) 634 33 97 w.33

fax +48(12) 634 33 97 w. 44



Znajdujące się tu dane przedstawiają kolejne etapy tworzenia przez autorkę własnej metody w oparciu o technikę nested-PCR. Wszystkie fazy zostały dobrze udokumentowane zdjęciami i wynikami liczbowym. Przedstawiono przekonujące kontrole wewnętrzne oraz kontrolę czułości i swoistości metody. Osiągnięto bardzo dobry wynik czułości opisaney metody, jakim jest możliwość wykrycia pojedynczego konidium *Aspergillus* w 1 mg tkanki.

W osiemnastostronicowym rozdziale *DYSKUSJA* porównano uzyskane wyniki z literaturą fachową. Dyskusja uzyskanych wyników jest logiczna i przekonująca i prowadzi do konkluzji, że nie odbiegają one w diametralny sposób od uzyskanych przez innych autorów. Przedstawione tendencje dotyczące zmian ilości wykrywanych zakażeń grzybiczych u pacjentów hospitalizowanych są podobne do obserwacji dokonanych w innych ośrodkach. Niestety, nie do końca udało mi się uzyskać odpowiedź na pytanie, które nasuwa się samo po lekturze wyników i dyskusji. Dlaczego wzrasta ilość zakażeń grzybiczych u pacjentów leczonych na OAiIT, kiedy w tym samym czasie na innych oddziałach nie obserwujemy takiego trendu?

Syntetyczne trzysstronicowe *PODSUMOWANIE* zawierające 16 punktów, okazuje się nad wyraz przydatne wobec tak dużej ilości przytoczonych danych eksperymentalnych prezentowanych w pięćdziesięciotrzystronicowym rozdziale *WYNIKI*.

Ujęte w dziesięciu punktach *WNIOSKI* wyciągnięte przez autorkę są logiczne i uprawnione w kontekście przedstawionych wyników badań. A najważniejsze z nich to:

- potwierdzenie zwiększenia ilości wykrywanych grzybów w próbkach pobranych od pacjentów OAiIT;
- wskazanie *Candida albicans* i *Candida glabrata* jako grzybów najczęściej będących przyczyną zakażeń/kolonizacji;
- wykazanie braku pokrewieństwa genetycznego większości izolowanych *Candida albicans* i *Candida glabrata* od chorych z OAiIT, co świadczy o pochodzeniu endogennym infekcji;
- opracowanie wysokoczułej i swoistej metody wykrywającej DNA grzybów z rodzaju *Aspergillus* w materiale klinicznym.

Pracę zamyka czterostronicowe *STRESZCZENIE* i tyleż samo stron liczące *SUMMARY*, które w sposób nieco nadmiernie dokładny referują główne tezy



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM  
MEDICUM

Wydział Nauk o Zdrowiu

Instytut Fizjoterapii

Zakład Fizjologii Medycznej

ul. Michałowskiego 12

PL 31-126 Kraków

tel. +48(12) 634 33 97 w.33

fax +48(12) 634 33 97 w. 44



rozprawy. W pracy zacytowano 211 pozycji piśmiennictwa, z których 97 zostało opublikowanych w ciągu czterech ostatnich lat.

Praca napisana została poprawnie, od strony formalnej spełniając wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Czyta się ją łatwo ze względu na dające się odczuć staranie autorki w celu minimalizacji użycia w tekście żargonu fachowego.

Niemniej w recenzowanej rozprawie można znaleźć błędy. I tak:

1. W rozdziale 1.3.1.5 *Ocena lekowrażliwości* – autorka powołuje się na dokument M44, M44-S3, M51-A, które bez dalszego rozwinięcia ani umieszczenia stosownego odnośnika pozostają zagadkowe dla czytającego niespecjalisty;
2. W rozdziale 1.3.3.1 *Diagnostyka serologiczna inwazyjnych zakażeń grzybiczych* – wzmiankowany w tekście „krab podkowiasty” w rzeczywistości jest skrzypłoczem (*Limulus*) zwanym też mieczogonem;
3. W mojej opinii rozdział 3.1.1.1 *Opis struktury Szpitala Specjalistycznego im. Ludwika Rydygiera* nie jest konieczny i nie wnosi nic do pracy;
4. W opisie procedury w rozdziale 3.2.2.2 - powtarza się brak kropek kończących zdania po skrócie „min.”, oraz występuje nieopisany nigdzie wcześniej tajemniczy „wzmacniacz precypitacji”;
5. W opisach odczynników służących do izolacji DNA pojawiają się niezdefiniowane co do składu bufory AC, SolP, roztwór równoważący K1, roztwór płuczący K2, roztwór elucyjny K3, mieszanina precypitacyjna PM;
6. W opisie *kontroli wewnętrznej* 3.3.2.3.3 – zastosowanie GAPDH ma na celu weryfikację czy ilość użytego do amplifikacji materiału była równa;
7. W rozdziale 3.3.2.5 opis wykonania stukrotnych rozcieńczeń jest nieco mylący i czytając go można odnieść wrażenie, że uzyskiwane jest rozcieńczenie dziesięciokrotne;
8. Nie udało mi się znaleźć kryterium, które stanowiło podstawę wyboru rodzaju materiału klinicznego do oznaczenia w nim obecności grzybów u pacjentów na różnych oddziałach szpitalnych;
9. Ryc.12 i 13 w opisie 102, 103, 104, 106 zamiast  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^6$ ;
10. Strona 117 „apiraty” zamiast „aspiraty”;
11. Ryc. 34 – w mojej ocenie próbka 91 wykazuje cechy degradacji DNA a nie zanieczyszczenia białkiem w trakcie izolacji;
12. Rozdział *Podsumowanie* zawiera niezrozumiałe określenie „patologicznie znamienne stężenie grzybów”.



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM  
MEDICUM

Wydział Nauk o Zdrowiu

Instytut Fizjoterapii

Zakład Fizjologii Medycznej

ul. Michałowskiego 12

PL 31-126 Kraków

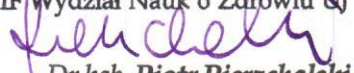
tel. +48(12) 634 33 97 w.33

fax +48(12) 634 33 97 w. 44

Przedstawione powyżej uwagi w żadnym stopniu nie wpływają bardzo wysoką ocenę dysertacji Pani Magister Marianny Małek, która spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim. Dlatego też, zwracam się do Wysokiej Rady o dopuszczenie Magister Marianny Małek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Piotr Pierzchalski

Zakład Fizjologii Medycznej  
IF Wydział Nauk o Zdrowiu NJ CM

  
Dr hab. Piotr Pierzchalski  
Adiunkt



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM  
MEDICUM

Wydział Nauk o Zdrowiu

Instytut Fizjoterapii

Zakład Fizjologii Medycznej

ul. Michałowskiego 12

PL 31-126 Kraków

tel. +48(12) 634 33 97 w.33

fax +48(12) 634 33 97 w. 44