

Białystok, 2021-05-10

Prof. dr hab. n. med. Anatol Panasiuk
Oddział Gastroenterologii, Hepatologii i Chorób Wewnętrznych z Ośrodkiem
Diagnostyki i Leczenia Endoskopowego
Wojewódzki Szpital Zespolony w Białymstoku,
Zakład Medycyny Klinicznej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku,

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Justyny Cieślik

OCENA PRZYDATNOŚCI METODY MALDI-TOF MS DO ANALIZY SZCZEPÓW

SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Zakażenia grzybicze w praktyce klinicznej występują stosunkowo często i dotyczą wielu grup chorych. Długotrwałe procesy chorobowe, immunosupresja, przewlekła antybiotykoterapia w tym skojarzona prowadzą do uszkodzenia mikrobioty organizmu, ułatwiając namnażanie się grzybów. Inwazyjne zakażenia grzybicze mogą pojawiać się u osób za cewnikami donaczyniowymi (zwłaszcza do żył centralnych) ze względu na tendencję do tworzenia biofilmów. Terapie infekcji grzybiczych są kosztochłonne i często muszą być prowadzone w warunkach szpitalnych. Powszechna diagnostyka zakażeń grzybiczych jest oparta o badanie mikrobiologiczne z wykorzystaniem selektywnych, promujących wzrost grzybów podłoży. Metody histopatologiczne, molekularne i genetyczne są mniej powszechne, ale wykorzystywane w diagnostyce specjalistycznej np. u osób po przeszczepach tkanek i narządów, będących w głębokiej immunosupresji. Najczęstszym patogennym grzybem



występującym u człowieka są drożdże z grupy *Candida*. Innym grzybem, rzadko wykrywanym są drożdże *Saccharomyces cerevisiae* var *boulardi*. Jest to grzyb przypisany do grupy drobnoustrojów probiotycznych. U osób zagrożonych dysbiozą przewodu pokarmowego chętnie stosowane są probiotyki, w tym preparaty zawierające grzyby *Saccharomyces boulardi*. W literaturze medycznej opisywane są kazuistyczne przypadki fungemii *Saccharomyces boulardii*, głównie u osób z poważnym naruszeniem ciągłości błony śluzowej przewodu pokarmowego w przebiegu zapalenia, owrzodzenia, martwicy lub z cewnikiem naczyn centralnych. Jednakże korzyści biologiczne płynące ze stosowania probiotyków są niekwestionowane.

Doktorantka ma duże doświadczenie kliniczne i naukowe w diagnostyce zakażeń grzybiczych. W pracy doktorskiej podjęła się nowego wyzwania, zastosowania nowej metody spektrometrii mas MALDI-TOF MS w diagnostyce zakażenia szczepami *Saccharomyces cerevisiae*. Spektrometria mas wspomagana matrycą z analizatorem czasu przelotu jest jednym z największych osiągnięć nauki ostatnich kilkunastu lat. Dzięki MALDI-TOF MS czas identyfikacji mikroorganizmów został skrócony z 24-48 godzin do zaledwie kilku minut, a wiarygodność identyfikacji drobnoustrojów jest porównywalna z technikami genetycznymi. Jednym z najnowszych zastosowań innowacyjnego systemu spektrometrii mas jest typowanie drobnoustrojów. Zasada metody MALDI-TOF MS doktorantka szczegółowo opisała we wstępie rozprawy doktorskiej.

Badania zostały przeprowadzone w Laboratorium Mikrobiologii Centralnym Szpitalu Klinicznym Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (CSK UCK WUM) oraz w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Materiał kliniczny do badań stanowiło 191 izolatów *Saccharomyces cerevisiae*

wyizolowanych w latach 2014-2016 z materiałów klinicznych (wymazy, posiewy) pobranych od pacjentów hospitalizowanych w Centralnym Szpitalu Klinicznym Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, z tego do badań wzięto 50 próbek. Na uwagę zasługuje fakt, że praca była przeprowadzona w Ośrodku o dużym doświadczeniu w badaniach nad drożdżami.

Doktorantka postawiła precyzyjnie określone cele pracy. Samodzielnie wykonywała typowanie drożdży genetyczną metodą elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym (PFGE), metodą spektrometrii mas (MALDI-TOF MS), porównywała te metody oraz podjęła się próby oceny przydatności metody MALDI-TOF MS w typowaniu drobnoustrojów. Należy podkreślić, że doktorantka podjęła duże wyzwanie badawcze, bowiem dotychczas nie wykorzystywano na taką skalę metody spektrometrii mas do analizy szczepów *Saccharomyces cerevisiae* w tak różnorodnym materiale klinicznym. Ponadto doktorantka, wykorzystując bardzo zaawansowane metody diagnostyki mikrobiologicznej podjęła się porównania szczepów *Saccharomyces cerevisiae* do drożdży *Saccharomyces boulardii* z preparatu Enterol. Należy zaznaczyć, że *Saccharomyces cerevisiae* wyhodowano od chorych, którym podawano probiotyczne grzyby *Saccharomyces boulardii*. Częściej izolowano szczepy od mężczyzn niż od kobiet (110 vs 81 szczepów). Największa liczba szczepów pochodziła od pacjentów hematologicznych (17,28%), pulmonologicznych (13,09%), OIT (12,04%). Dużą część szczepów (35 szczepów) stanowiły drożdże wyizolowane z posiewu krwi obwodowej, krwi pobranej przez cewnik centralny i z fragmentu cewnika centralnego (103) oraz z dolnych dróg oddechowych 42 szczepy *Saccharomyces cerevisiae*. Należy podkreślić, że doktorantka poddała typowaniu tylko wybrane szczepy – głównie te wyizolowane od pacjentów narażonych na zakażenie inwazyjne.



Doktorantka podkreśla, że przedmiotem pracy nie była ocena, czy u pacjentów doszło do zakażenia inwazyjnego, lecz analiza czy szczepy probiotyczne wykazywały podobieństwo do szczepów klinicznych oraz ocena możliwości zastosowania metody MALDI-TOF MS do badania pokrewieństwa szczepów w odniesieniu do metody genetycznej PFGE.

Z analizy PFGE wynika, że większość badanych szczepów klinicznych *Saccharomyces cerevisiae* (43 szczepy) wykazuje ten sam wzór prążków, co szczep laboratoryjny *Saccharomyces boulardii* MYA-797 oraz szczepy wyizolowane z preparatów Enterolu i Floralis. Natomiast różnice w ułożeniu prążków zaobserwowano w przypadku 7 szczepów klinicznych i 5 szczepów kontrolnych. Autorka sugeruje, że większość zakażeń o etiologii *Saccharomyces cerevisiae* związana jest niewątpliwie ze stosowaniem w terapii probiotyków zawierających komórki tych drożdży.

Podstawą typowania MALDI-TOF MS jest analiza widm mas uzyskanych dla określonego drobnoustroju. Widmo mas jest unikatowe dla każdego mikroorganizmu. W analizach widm w spektrometrii mas doktorantka porównywała szczepy kliniczne ze szczepami kontrolnymi oraz ze szczepem wyizolowanym z Enterolu. Typowanie drożdży metodą MALDI-TOF MS pozwoliło doktorantce wyodrębnić 5 różnych profili białkowych szczepów *Saccharomyces cerevisiae*. Podstawą zaszeregowania do grup było stwierdzenie różnic – obecność lub brak pików przy określonych wartościach m/z pomiędzy badanymi szczepami. Grupa 1 stanowiła 44 szczepy kliniczne, szczep wyizolowany z probiotyku (Enterol) oraz szczep kontrolny *Saccharomyces boulardii* MYA-797 oraz grupy 2, 3 i 4 po 2 szczepy kliniczne. W grupie 5 zaszeregowano szczepy kontrolne *Saccharomyces cerevisiae*: szczep wyizolowany z drożdży piekarskich i dwa szczepy z różnych kolekcji oraz szczep winiarski Lalvin 71B.

Doktorantka dokonała skrupulatnej, wszechstronnej oceny wyników badań, a wyniki przedstawiła w przejrzystej formie graficznej w licznych tabelach, wykresach i histogramach. Na podstawie typowania metodą PFGE analiz elektroforetycznych chromosomalnego DNA *Saccharomyces cerevisiae* doktorantka umieściła w dendrogramie zróżnicowane profile filogenetyczne wszystkich zidentyfikowanych szczepów przyporządkowując je do określonych klastrow A-F. Porównanie grup wykazało, że większość szczepów wyizolowanych z materiałów klinicznych miała taki sam wzór pików, jak szczep wyizolowany z probiotyku Enterol i szczep kontrolny MYA-797.

Dużą wartością praktyczną pracy jest włączenie do szerokiego panelu badawczego mikrobiologów, badania spektrometrii mas do porównywania szczepów drobnoustrojów. W codziennej praktyce mikrobiologicznej, metoda ta jest trudno dostępna ze względu na wysoki koszt aparatury. Jednak zaletą jest szybkość oraz bardzo niski koszt jednostkowego badania. Ponadto doktorantka wskazuje na przydatność tej metody i możliwość pominięcia typowania drobnoustrojów przy użyciu metody PFGE, która jest w odróżnieniu czaso- i kosztochłonna.

Doktorantka słusznie stawia tezę, że konieczne są skuteczne, szybkie i ekonomiczne metody umożliwiające przeprowadzenie wiarygodnej analizy w bardzo krótkim czasie, co umożliwi wdrożenie racjonalnej i skutecznej antybiotykoterapii. Zwraca uwagę, jak bardzo ważna jest dostępność tych metod, które usprawniają rutynową diagnostykę mikrobiologiczną, w tym system MALDI-TOF MS.

Stosunkowo niewiele placówek klinicznych ma możliwość typowania szczepów techniką MALDI-TOF MS. Narastający problem występowania szczepów wielolekoopornych odpowiedzialnych za zakażenia o ciężkim przebiegu klinicznym, z ograniczonymi opcjami terapeutycznymi sprawia, że poszukuje się szybkich i efektywnych metod badawczych.

Badania doktorantki wskazują, że metoda typowania drobnoustrojów z wykorzystaniem techniki MALDI-TOF MS mogą być w przyszłości jedną z głównych metod mogących mieć zastosowanie w celach diagnostycznych oraz epidemiologicznych.

Autorka z dużą łatwością przeprowadza konfrontację własnych wyników badań z wynikami innych badaczy. Doktoranta postawiła 6 wniosków, które są prawidłowo sformułowane i wynikają z przeprowadzonych badań oraz są odzwierciedleniem postawionych celów badawczych. Na podstawie przeprowadzonych badań molekularnych doktorantka sugeruje, że techniką MALDI-TOF MS można wykazać różnice pomiędzy szczepami w obrębie tego samego gatunku, co może mieć znaczenie praktyczne w klinicznych laboratoriach diagnostycznych

O innowacyjności pracy doktorskiej świadczy fakt, że nie ma w literaturze medycznej doniesień o typowaniu tak dużej liczby szczepów drożdży techniką MALDI-TOF MS w systemie MALDI Biotyper.

Podsumowując należy podkreślić, że praca doktorska mgr Justyny Cieślik jest doskonałą monografią o zastosowaniu techniki spektrometrii mas w diagnostyce mikrobiologicznej i należałoby upowszechnić wyniki jej badań dla szerokiego kręgu mikrobiologów i klinicystów. Pracę doktorską czyta się z największą przyjemnością, jest napisana w sposób przystępny.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Justyny Cieślik jest pracą wartościową, ma walory poznawcze oraz ważne znaczenie praktyczne, zawiera wiele cennych informacji naukowych i klinicznych. 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.).

Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie pracy ze względu na jej wyjątkową
innowacyjność i odkrywczność.

Mam zaszczyt wystąpić do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego
Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Justyny Cieślik do dalszych etapów przewodu
doktorskiego.

6362408 Prof. dr hab. med. ANATOL PANASIUK
specjalista chorób zakaźnych,
medycyny (mokrej i tropikalnej),
zdrowia publicznego
choroby wewnętrzne, patomorfologia