

Prof. dr hab. n. med. Stefania Giedrys-Kalemba  
em. kierownik Katedry i Zakładu Mikrobiologii i Immunologii  
Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie

## Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Justyny Cieřlik pt.

### „Ocena przydatności metody MALDI-TOF MS do analizy szczepów *Saccharomyces cerevisiae*”

Ogromny postęę w medycynie w ostatnich dekadach związany z wprowadzeniem inwazyjnych metod diagnostycznych i leczniczych, a także stosowaniem antybiotyków o szerokim spektrum i chemioterapeutyków prowadzi, niestety, do stałego wzrostu zakażeń o etiologii grzybiczej. Wprawdzie wciąż dominują zakażenia wywołane przez grzyby z rodzaju *Candida*, ale coraz częściej opisuje się inne grzybicze czynniki etiologiczne, w tym *Saccharomyces cerevisiae*. Jak się okazuje, drożdżaki te, wykorzystywane powszechnie w przemyśle spożywym, mogą wywoływać także zakażenia inwazyjne, w tym fungemie odcewnikowe. Należy wówczas przeprowadzić dochodzenie epidemiologiczne w celu ustalenia dróg transmisji i ewentualnie źródła zakażenia. W ostatnich latach do identyfikacji i typowania drobnoustrojów, oprócz sprawdzonych już metod genetycznych, próbuje się wykorzystywać również metodę spektrometrii mas określającą unikatowe profile białkowe szczepów. Jak dotąd, metoda ta nie była stosowana do analizy klinicznych szczepów *Saccharomyces cerevisiae*.

Z przedstawionych wyżej powodów, wybór tematu pracy dotyczący badań porównawczych szczepów *Saccharomyces cerevisiae* metodą PFGE (uważaną za *gold standard* w typowaniu szczepów) oraz techniką spektrometrii mas MALDI-TOF MS uważam za niezwykle ważny i aktualny, zarówno w aspekcie poznawczym jak i aplikacyjnym.

Rozprawa doktorska liczy łącznie 149 stron maszynopisu, w tym 8 rozdziałów, 40 rycin i 4 tabele. Została przygotowana z zachowaniem typowego dla takich opracowań układu. Kolejne rozdziały to: *Wstęp*, *Założenia i cel pracy*, *Material i metody*, *Wyniki*, *Dyskusja*, *Wnioski*, *Piśmiennictwo* oraz *Aneks*, a także Spis rycin i tabel, Wykaz stosowanych skrótów, Streszczenie w jęz. polskim i angielskim. *Aneks* zawiera: *Oświadczenie Komisji Etycznej*, że przedmiotowe badanie nie wymaga opinii Komisji Etycznej oraz 4 *Załączniki*: Szczegółowy wykaz próbek klinicznych, Szczepy wybrane do typowania metodą PFGE i MALDI-TOF MS, Oznaczenia szczepów klinicznych *Saccharomyces cerevisiae* w PFGE i MALDI-TOF MS oraz Oznaczenia szczepów kontrolnych w PFGE i MALDI-TOF MS.

W obszernym *Wstępie* (39 stron) Autorka najpierw krótko omawia zasady klasyfikacji grzybów z rodzaju *Candida* i *Saccharomyces*, następnie szeroko charakteryzuje gatunki *Saccharomyces cerevisiae* i *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, w tym ich działanie probiotyczne, wykorzystanie w inżynierii genetycznej do produkcji szczepionek i w badaniach chorób neurodegeneracyjnych u ludzi, a także chorobotwórczość i możliwości leczenia zakażeń wywołanych przez *Saccharomyces cerevisiae*. Szczegółowo przedstawione są metody hodowli i identyfikacji drożdży oraz grzybów drożdżopodobnych, także diagnostyki klinicznej zakażeń

grzybiczych z wykorzystaniem różnych metod. W kolejnym podrozdziale opisuje metody fenotypowe i genotypowe, stosowane w typowaniu epidemiologicznym szczepów, podając zasady, wady i zalety metody PFGE i MALDI-TOF MS. Ostatni podrozdział poświęcony jest mechanizmom powstawania biofilmu, jego roli w zakażeniach grzybiczych i zróżnicowanej oporności na leki przeciwgrzybicze. Całość uzupełnia 18 czytelnych, kolorowych rycin, w większości pochodzących z własnych zbiorów.

Rozdział ten niewątpliwie świadczy o dużej wiedzy Doktorantki w zakresie poruszanych zagadnień i w pełni uzasadnia postawienie celu badań własnych.

Celem badań była analiza wybranych szczepów *Saccharomyces cerevisiae* wyizolowanych z materiałów klinicznych od pacjentów hospitalizowanych w Szpitalu Klinicznym WUM oraz kontrolnych metodą PFGE i MALDI-TOF MS oraz porównanie uzyskanych wyników.

*Materiał i metody.* Wstępny materiał kliniczny stanowiło 191 szczepów *Saccharomyces cerevisiae* pochodzących z różnych materiałów klinicznych pobranych od pacjentów hospitalizowanych w wieloprofilowym Szpitalu Klinicznym WUM w latach 2014-2016. Najczęściej były to szczepy izolowane z dolnych dróg oddechowych, kału, krwi obwodowej i płwociny. Z tej puli Doktorantka wybrała 50 szczepów, wyizolowanych najczęściej z krwi obwodowej (12), dolnych dróg oddechowych (11), cewnika naczyniowego (6) i jamy otrzewnowej (6), które poddano typowaniu PFGE oraz MALDI-TOF MS z wykorzystaniem systemu MALDI Biotyper (Bruker). Kontrolnie w obu metodach zastosowano odpowiednio dobranych po 8 szczepów kontrolnych.

Rozdział jest napisany zwięźle i treściwie. Opis badań, prowadzonych na dużej, reprezentatywnej liczbie szczepów oraz stosowane metody badań i analizy danych, w tym statystyczne, nie budzą zastrzeżeń. Należałoby jednak w podpunkcie 3.2. *Materiał kliniczny* podać kryteria kwalifikacji/wykluczenia szczepów klinicznych do badań z całej puli, jak również dodać podpunkt dotyczący szczepów kontrolnych. Szczepy kontrolne są wymienione w opisach metod, bez odniesienia do Załącznika 4 w *Aneksie*, a jednym z celów pracy jest izolacja i typowanie szczepu *Saccharomyces var. boulardii* pochodzącego z probiotyku (w pracy były wykorzystane dwa probiotyki: Enterol i Floralis).

(Drobna uwaga redakcyjna – tytuły tabel zamieszczamy nad tabelą, tytuły rycin – pod ryciną).

Rozdział *Wyniki badań* liczy aż 49 stron i stanowi najbardziej obszerną część pracy. Autorka, zgodnie z postawionymi celami badań, kolejno przedstawia wyniki analiz wybranych szczepów klinicznych i kontrolnych metodą PFGE i MALDI-TOF MS. Opisane wyniki bardzo dobrze ilustrują i uwiarygadniają wyraźne, kolorowe ryciny, szczególnie dotyczące analizy widm. Szczepy zakwalifikowane do badań pochodziły od pacjentów hospitalizowanych w oddziale hematologicznym, pulmonologicznym i OIT, u których najczęściej dochodzi do rozwoju zakażeń grzybiczych, w tym wywołanych przez szczepy *Saccharomyces*. Wyniki porównania 50 szczepów klinicznych *Saccharomyces cerevisiae* oraz szczepu wyizolowanego z preparatu Enterol i szczepu wzorcowego *Saccharomyces boulardii* w obu metodach były zgodne. Jedynie jeden szczep kliniczny wykazał różnice w profilu chromosomów w metodzie PFGE, ale nie w profilu białkowym. Różne profile (5 szczepów – 3 profile) w metodzie PFGE wykazały zaś szczepy kontrolne pochodzące z różnych źródeł, przy braku różnic w profilach białkowych.

Na uwagę zasługuje obszerny (16 stron) rozdział *Dyskusja*, gdzie Autorka używając już aktualnego słownictwa omawia mikrobiom człowieka, z uwzględnieniem gatunku *Saccharomyces cerevisiae* i jego udziału w zakażeniach inwazyjnych, w tym występujących u

pacjentów przyjmujących preparaty probiotyczne (var. *boulardii*). Następnie szczegółowo omawia, porównuje i dyskutuje wyniki badań własnych z podobnymi badaniami innych autorów, aczkolwiek do tej pory ukazało się tylko jedno opracowanie dotyczące typowania metodą MALDI-TOF MS tych grzybów. Obejmowało ono 4 szczepy kliniczne *Saccharomyces cerevisiae*, które wykazały profil białkowy zgodny ze szczepem probiotycznym (poz. 151 piśmiennictwa, IF 2,49). Ze względu na wzrastającą w ostatnich latach konsumpcję probiotyków, problem zakażeń szczepami probiotycznymi staje się coraz większym wyzwaniem dla mikrobiologów, a wykazanie możliwości wykorzystania szybkiej i taniej metody MALDI-TOF MS do typowania i porównywania szczepów drożdży niewątpliwym aspektem praktycznym badań wykonanych przez Doktorantkę.

Pracę podsumowuje 5 prawidłowo wyciągniętych wniosków, w tym o znaczeniu praktycznym, wskazującym metodę MALDI-TOF MS z wykorzystaniem systemu MALDI Biotyper jako przydatną do badań porównawczych szczepów, przynajmniej we wstępnym dochodzeniu epidemiologicznym.

Piśmiennictwo jest imponujące, liczy 177 pozycji. Jest starannie dobrane i nienagannie przedstawione w kolejności cytowania. Autorka wykorzystuje głównie artykuły oryginalne z ostatnich lat, obcojęzyczne i polskie, także strony internetowe.

Streszczenia, w języku polskim i angielskim są zwięzłe, zawierają najważniejsze wyniki i wnioski dotyczące przedmiotu przeprowadzonych badań.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Justyny Cieślik jest wykonana w oparciu o dużą liczbę szczepów klinicznych i kontrolnych *Saccharomyces cerevisiae*, które zostały profesjonalnie przeanalizowane i porównane. Całość jest przedstawiona praktycznie nienagannie merytorycznie i redakcyjnie, opatrzona bogatą dokumentacją graficzną. Praca zawiera zarówno elementy poznawcze jak i aplikacyjne. Wyniki wykazały, że system spektrometrii mas może wykorzystany do analizy i porównywania także szczepów grzybów. Z drugiej strony, zaklasyfikowanie szczepów klinicznych do tej samej grupy co szczepy probiotyczne zmusza nas do rozważnego stosowania probiotyków na co dzień. Całość świadczy o bardzo dobrym opanowaniu warsztatu naukowego przez Doktorantkę.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr Justyna Cieślik pt. „Ocena przydatności metody MALDI-TOF MS do analizy szczepów *Saccharomyces cerevisiae*” zasługuje na wyróżnienie.

Uzasadnienie:

- po raz pierwszy w świecie dokonano analizy i porównania dużej liczby (50) szczepów klinicznych *Saccharomyces cerevisiae* oraz odpowiednio dobranych szczepów kontrolnych, w tym pochodzących z preparatów probiotycznych,
- do badań wykorzystano technikę spektrometrii mas MALDI-TOF MS uważaną za jedną z najważniejszych osiągnięć nauki w ostatnich latach oraz porównawczo metodę genetyczną PFGE, uważaną *gold standard* w typowaniu szczepów,
- wyniki, przedstawione w sposób niezwykle przejrzysty i wiarygodny, wykazały wysoką zgodność obu metod w typowaniu klinicznych szczepów *Saccharomyces cerevisiae* na poziomie 98%, jak również zgodność ze szczepami probiotycznymi,

- istotnym praktycznym wnioskiem jest potwierdzenie przydatności metody MALDI-TOF MS w typowaniu szczepów *Saccharomyces cerevisiae* w ogniskach zakażeń, co najmniej jako metody przesiewowej,
- analizowany problem jest niezwykle ważny i aktualny – cały czas wzrasta liczba zakażeń grzybiczych, zwłaszcza wśród pacjentów z czynnikami ryzyka, których mamy coraz więcej; ponadto obserwuje się coraz większą medialną presję i brak rozważności w konsumpcji preparatów probiotycznych.

Praca powinna być jak najszybciej opublikowana i to w dobrym czasopiśmie. Chciałabym dodać, że podobny temat, opisany jako przypadek bakteriemii *Lactobacillus rhamnosus* u młodej dziewczyny spożywającej w dużej ilości różne probiotyki, gdzie potwierdziliśmy metodą PFGE identyczność szczepu wyizolowanego z krwi od pacjentki ze szczepem probiotycznym opublikowaliśmy w 2011 roku w *Clin Microbiol Infect* (IF 4,54).

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 2018 r. Przepisy wprowadzające Ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 z późn.zm.) i dlatego zwracam do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o dopuszczenie mgr Justyny Cieślik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Szczecin, 17 maja 2021 r.

Prof. dr hab. n.n.ed.  
Stefania Giedrys-Kalamba  
1012475