

mgr Justyna Cieřlik

**Ocena przydatnořci metody MALDI-TOF MS do analizy
szczepów *Saccharomyces cerevisiae***

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: prof. dr hab. n. med. Marta Wróblewska

Laboratorium Mikrobiologii CSK UCML UCK WUM



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2021

Marta Wróblewska

Justyna Cieřlik

Streszczenie w języku polskim

W ciągu ostatnich lat obserwuje się wzrost liczby zakażeń inwazyjnych o etiologii grzybiczej, co jest ściśle związane z rozwojem medycyny, a także z wprowadzaniem inwazyjnych metod diagnostycznych oraz z rozwojem chirurgii, zwłaszcza w dziedzinie transplantacji narządów. Ponadto do wzrostu liczby tych zachorowań przyczynia się m. in. stosowanie szerokospektralnej antybiotykoterapii czy agresywna chemioterapia. Problem zakażeń grzybiczych dotyczy głównie pacjentów onkologicznych oraz osób z zaburzeniami mechanizmów odpornościowych.

Największe znaczenie kliniczne wśród grzybów drożdżopodobnych odpowiedzialnych za układowe zakażenia i jednocześnie ich najczęstszym czynnikiem etiologicznym są grzyby z rodzaju *Candida*. Coraz więcej jednak jest doniesień na temat zakażeń wywołanych przez grzyby z rodzaju *Saccharomyces*. Najczęściej izolowanym gatunkiem tego rodzaju jest *Saccharomyces cerevisiae*.

Saccharomyces boulardii został odkryty w 1923 r. przez francuskiego uczonego Henriego Boularda. Po raz pierwszy szczep został zarejestrowany jako lek w 1953 r., i do tej pory jest to jedyny zarejestrowany tego typu probiotyk. Przez lata zastanawiano się, czy *Saccharomyces boulardii* (szczep probiotyczny) powinien być klasyfikowany jako odrębny gatunek, czy też jako podgatunek *Saccharomyces cerevisiae*. Początkowo identyfikowany był jako osobny gatunek. Według obecnie obowiązującej nomenklatury Międzynarodowy Kodeks Nomenklatury Botanicznej (ang. International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants, ICN) podaje, że drożdże *Saccharomyces boulardii* należy klasyfikować jako *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*.

Saccharomyces cerevisiae do tej pory znany był jako drożdże niepatogenne wykorzystywane w przemyśle spożywczym. Obecnie gatunek ten jest przedmiotem wielu prac naukowych związanych z tematyką zakażeń inwazyjnych, ponieważ w roli inwazyjnego patogenu nie jest jeszcze dobrze poznany. Odnotowuje się coraz częściej, że jest czynnikiem etiologicznym fungemii (w tym fungemii odcewnikowyc u pacjentów z obniżoną odpornością i u osób, u których stosowano probiotyki zawierające komórki drożdży. Ukazuje się coraz więcej prac naukowych związanych z tą tematyką. Zakażenia o etiologii *Saccharomyces cerevisiae* ściśle związane są z zakażeniami odcewnikowymi, z tego względu, że drożdże tego gatunku wykazują zdolność tworzenia biofilmu.

Typowanie drobnoustrojów przeprowadza się zazwyczaj w celach epidemiologicznych. Na potrzeby dochodzeń epidemiologicznych wykorzystuje się różne metody genotypowe i fenotypowe, dzięki którym można wykryć źródło epidemii, sposób transmisji szczepów czy obszar występowania. Badania genetyczne szczepów stają się bardzo ważne we współczesnej mikrobiologii. Pojawiające się nowe czynniki wirulencji, narastająca oporność drobnoustrojów na antybiotyki czy środki dezynfekcyjne powodują, że typowanie szczepów okazuje się niezwykle pomocne w wykrywaniu zakażeń związanych z opieką zdrowotną, a tym samym odgrywa istotną rolę w zapobieganiu rozprzestrzenianiu się szczepów wielolekoopornych w placówkach ochrony zdrowia. Nową techniką, lecz coraz powszechniej stosowaną w klinicznych laboratoriach mikrobiologicznych, jest identyfikacja mikroorganizmów na podstawie ich profilu białkowego z wykorzystaniem spektrometrii mas – MALDI-TOF MS (ang. matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry). Metoda MALDI-TOF MS polega na analizie białek rybosomalnych, które w drobnoustrojach występują w dużych ilościach i są unikatowe dla danej rodziny, rodzaju i gatunku, a także szczepu drobnoustroju. Umożliwia to identyfikację bakterii (tlenowych i beztlenowych) oraz grzybów (drożdżopodobnych i pleśniowych). Jedną z najnowszych propozycji innowacyjnego wykorzystania systemu spektrometrii mas MALDI-TOF jest typowanie drobnoustrojów z wykorzystaniem tej techniki. Aktualnie brak jest doniesień w literaturze naukowej na temat typowania szczepów klinicznych drożdży z rodzaju *Saccharomyces*.

Załoženiami niniejszej pracy był: przegląd szczepów klinicznych *Saccharomyces cerevisiae* wyizolowanych z materiałów pobranych od pacjentów hospitalizowanych w SP CSK WUM (obecnie CSK UCK WUM) w latach 2014-2016, analiza wybranych szczepów klinicznych *Saccharomyces cerevisiae* metodą genetyczną PFGE i techniką spektrometrii mas MALDI-TOF MS, izolacja i typowanie tymi samymi metodami szczepu probiotycznego *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, a następnie porównanie uzyskanych wyników obiema metodami.

Celem głównym niniejszej pracy była ocena przydatności metody MALDI-TOF MS do typowania drobnoustrojów z wykorzystaniem szczepów klinicznych i probiotycznych *Saccharomyces cerevisiae*. W tym celu 50 szczepów klinicznych *Saccharomyces cerevisiae* typowano metodą PFGE jako metodą referencyjną. Szczepy poddano typowaniu także techniką MALDI-TOF MS, a następnie porównano ze szczepem *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* wyizolowanym z probiotyku oraz szczepem laboratoryjnym *Saccharomyces*

boulardii MYA-797. Dodatkowo włączono do analizy typowania techniką MALDI-TOF MS szczep *Saccharomyces cerevisiae* uzyskany z hodowli drożdży piekarskich, a do typowania metodą PFGE – szczep wyizolowany z preparatu Floralis. Do badań wykorzystano, także 5 szczepów kontrolnych (BY4741-1, BY4741-2, W303, S288c i Lalvin 71B). Każdą z metod typowano po 58 szczepów (50 klinicznych i 8 kontrolnych).

Po przeprowadzeniu typowania metodą PFGE wykazano, że zdecydowana większość szczepów *Saccharomyces cerevisiae* wyizolowanych z materiałów klinicznych miała taki sam profil prążków jak szczep probiotyczny *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. Podobne wyniki uzyskano stosując technikę MALDI-TOF MS, gdzie większość badanych izolatów miała taki sam wzór pików jak szczep wyizolowany z probiotyku Enterol. Wyniki typowania obiema metodami były podobne, a rozbieżność między wynikami była nieznaczna.

Po przeprowadzeniu analizy wyników typowania szczepów *Saccharomyces cerevisiae* sformułowano następujące wnioski:

1. Największą liczbę szczepów *Saccharomyces cerevisiae* wyizolowan z materiałów klinicznych pochodzących od pacjentów hematologicznych (17,28%), hospitalizowanych w oddziale pulmonologicznym (13,09%) i w OIT (12,04%)
2. Wyniki typowania 50 szczepów klinicznych *Saccharomyces cerevisiae* metodą MALDI-TOF MS z wykorzystaniem systemu MALDI Biotyper (Bruker) są zgodne z wynikami typowania metodą genetyczną PFGE w liczbie 49/50, co stanowi 98%
3. Większość typowanych szczepów klinicznych z wykorzystaniem metody PFGE i MALDI-TOF MS została sklasyfikowana do tej samej linii filogenetycznej/grupy, co szczepy probiotyczne
4. Typowanie drobnoustrojów metodą MALDI-TOF MS może być stosowane jako metoda wstępna/przesiewowa w dochodzeniu epidemiologicznym w ognisku zakażeń
5. W literaturze naukowej brak jest dotąd doniesień na temat typowania klinicznych szczepów *Saccharomyces cerevisiae* metodą MALDI-TOF MS, co zastosowano w niniejszej pracy.