

lek. Agnieszka Piwowarczyk

**Analiza przydatności technik
sekwencjonowania następnej generacji
do oceny występowania czynników zakaźnych
w zapaleniu wnętrza gałki ocznej**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

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

Katedra i Klinika Okulistyki

Wydział Lekarski Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Samodzielny Publiczny Kliniczny Szpital Okulistyczny

Kierownik Katedry i Kliniki: Prof. dr hab. n. med. Jacek Paweł Szaflik



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

WARSZAWA 2022

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Liczne doniesienia naukowe potwierdzają trudności w identyfikacji za pomocą tradycyjnych metod hodowlanych drobnoustrojów w ciele szklistym i w komorze przedniej oka u pacjentów z zapaleniem wnętrza gałki ocznej. Jedną z przyczyn może być bardzo mała objętość próbek okulistycznych oraz konieczność szybkiego wdrożenia leczenia przeciwdrobnoustrojowego ze względu na zagrożenie utraty gałki ocznej.

Badania z zastosowaniem technik sekwencjonowania następnej generacji dają możliwość oceny występowania w materiałach klinicznych drobnoustrojów, których hodowla jak dotąd nie jest możliwa lub które nie są żywotne z powodu terapii przeciwdrobnoustrojowej już wdrożonej u danego pacjenta.

Głównym celem pracy była ocena przydatności technik sekwencjonowania do oceny występowania czynników zakaźnych w materiale klinicznym pobranym z oka u pacjentów z zapaleniem wnętrza gałki ocznej. Szczegółowe cele badania to:

1. Porównanie danych uzyskanych metodą hodowlaną z danymi uzyskanymi za pomocą sekwencjonowania NGS materiału pobranego z ciała szklistego i z komory przedniej oka.
2. Porównanie danych uzyskanych za pomocą sekwencjonowania materiału biologicznego pobranego z komory przedniej oka z danymi uzyskanymi za pomocą sekwencjonowania materiału biologicznego pobranego z ciała szklistego danego pacjenta.
3. Ocena taksonomiczna drobnoustrojów w materiale pobranym z ciała szklistego i z komory przedniej oka za pomocą techniki NGS.
4. Ocena za pomocą metod NGS występowania drobnoustrojów w 9 postaciach klinicznych ZWGO.

Analizą objęto 59 pacjentów z zapaleniem wnętrza gałki ocznej (ZWGO), którzy byli hospitalizowani w Samodzielnym Publicznym Klinicznym Szpitalu Okulistycznym (SPKSO). Grupę A stanowili pacjenci (n=33) z ZWGO leczeni w SPKSO w okresie 5 lat (od 01.09.2013 r. do 31.10.2018 r.), u których dokonano retrospektywnej analizy etiologii zakażenia na podstawie wyników badań metodami hodowlanymi próbek klinicznych pobranych z komory przedniej – KP (n=13) oraz z ciała szklistego – CS (n=28). Grupę B stanowili chorzy (n=26) z rozpoznaniem ZWGO, którzy zgłosili się w okresie > 3 lat (od 01.11.2018 r. do 31.01.2022 r.), z innych ośrodków okulistycznych do SPKSO w celu wykonania pilnej witrektomii przez część płaską ciała rzęskowego (ang. pars plana vitrectomy, PPV).

Materiał kliniczny pobrany podczas zabiegu operacyjnego z komory przedniej (n=17) i ciała szklistego (n=26) gałki ocznej zbadano za pomocą tradycyjnych metod hodowlanych

(standardowe postępowanie) oraz w grupie B pacjentów dodatkowo przy użyciu technik sekwencjonowania następnej generacji (ang. next generation sequencing, NGS). Przy użyciu NGS II generacji na platformie MiSeq (Illumina) zbadano 10 próbek pobranych z komory przedniej oka oraz 21 próbek ciała szklistego, natomiast metodą NGS III generacji na platformie GridION X5 (ONT) zbadano 5 próbek pobranych z komory przedniej oka oraz 7 próbek ciała szklistego.

W wyniku sekwencjonowania NGS II generacji materiału biologicznego pobranego z gałki ocznej (CS, KP) oraz analizy bioinformatycznej uzyskano 466 operacyjnych jednostek taksonomicznych (ang. operational taxonomic unit, OTU), które zostały przypisane do poziomu taksonomicznego – rodzaju. W poszukiwaniu różnic w mikrobiomie na poziomie rodzaju wewnątrz danej próbki biologicznej (alfa bioróżnorodność) oraz pomiędzy grupami próbek (beta bioróżnorodność), w niniejszej pracy wykonano dwie analizy statystyczne (dwóch typów danych – uwzględniających rodzaj *Escherichia* i bez rodzaju *Escherichia*) dla 11 grup próbek: ciało szkliste (CS) vs komora przednia (KP) oraz między 9 postaciami klinicznymi zapalenia wnętrza gałki ocznej.

W pierwszej analizie statystycznej uwzględniającej rodzaj *Escherichia* wykazano, że struktura mikrobiomu wewnątrz danej próbki i wewnątrz danej grupy próbek nie wykazuje różnic istotnych statystycznie. W drugiej analizie statystycznej bez rodzaju *Escherichia* wykazano istotne statystycznie różnice w strukturze mikrobiomu wewnątrz danej próbki i wewnątrz danej grupy próbek. Powodem tych różnic w analizie statystycznej wyników było wykluczenie w drugiej analizie rodzaju *Escherichia* biorąc pod uwagę możliwość kontaminacji, jednak odmienna procentowość rodzajów nie miała wpływu na wartości prawdopodobieństwa.

Na podstawie analizy wyników przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski:

1. Techniki sekwencjonowania następnej generacji (NGS) umożliwiają wykrycie czynników zakaźnych w materiale biologicznym pobranym z gałki ocznej pacjentów z rozpoznaniem zapalenia wnętrza gałki ocznej (ZWGO).
2. W materiale pobranym z komory przedniej oka (KP) i ciała szklistego (CS) metoda hodowlana umożliwiła identyfikację bakterii należących do 3 rodzajów i 6 gatunków, natomiast technika NGS umożliwiła identyfikację bakterii do 103 rodzajów i 78 gatunków.
3. W materiale pobranym z KP i CS metoda hodowlana umożliwiła identyfikację grzybów należących do 1 rodzaju i 1 gatunku, natomiast technika NGS potwierdziła wszystkie dodatnie posiewy *Candida albicans* oraz dodatkowo wykazała obecność materiału genetycznego innych grzybów (np. *Hypocreales*, *Agaricomycete*).

4. Za pomocą technik NGS w materiale pobranym z KP u pacjentów z ZWGO w analizie statystycznej z uwzględnieniem rodzaju *Escherichia* stwierdzono dominację bakterii z rodzaju *Escherichia* (do 93,1% w próbce), natomiast bez rodzaju *Escherichia* wykazała dominację bakterii z rodzaju *Streptococcus* (do 17,6% w próbce).
5. Za pomocą technik NGS w materiale pobranym z CS u pacjentów z ZWGO w analizie statystycznej z uwzględnieniem rodzaju *Escherichia* stwierdzono dominację bakterii z rodzaju *Escherichia* (do 75,9% w próbce), natomiast po wykluczeniu rodzaju *Escherichia* stwierdzono dominację bakterii z rodzaju *Staphylococcus* (do 28,7% w próbce).
6. W KP najczęściej występowały bakterie z rodzaju *Streptococcus* oraz niezdefiniowany rodzaj z rodziny *Micrococcaceae*, natomiast w CS – bakterie z rodzaju *Staphylococcus* i *Enterococcus*.
7. Za pomocą technik NGS w 9 postaciach klinicznych ZWGO w analizie statystycznej z uwzględnieniem rodzaju *Escherichia* najwięcej zidentyfikowano bakterii z rodzaju *Escherichia* według kolejności: po zapaleniu rogówki, po przeszczepieniu rogówki oraz po witrektomii, natomiast w analizie bez rodzaju *Escherichia* stwierdzono dominację: po iniekcji leku anti-VEGF oraz po operacji zaćmy – bakterie z rodzaju *Staphylococcus*, w ZWGO związanym z pęcherzykiem – bakterie z rodzaju *Streptococcus*, po przeszczepieniu rogówki – bakterie z rodziny *Micrococcaceae*, a po zapaleniu rogówki – zróżnicowana mikroflora bakteryjna (w tym bakterie z rodzaju *Serratia* i *Halolactibacillus*).
8. Ośrodki wykonujące badania NGS powinny dążyć do uzyskania konsensusu w kwestii wyboru odpowiedniej metody sekwencjonowania do analizy próbek okulistycznych.

Marta Wóblewska
Agnieszka Paweł