

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Tytuł: Opracowanie i optymalizacja referencyjnych baz danych dla dwóch nowych metod molekularnych do identyfikacji gatunków bakterii z rodzaju *Staphylococcus*.

Autor: mgr Maja Kosecka-Strojek

Promotor: prof. dr hab. Jacek Międzobrodzki; **Promotor pomocniczy:** dr Artur Sabat (University Medical Center Groningen, The Netherlands)

Bakterie z rodzaju *Staphylococcus* należą do oportunistycznych patogenów o dużym znaczeniu klinicznym. W związku z rozwojem medycyny oraz diagnostyki mikrobiologicznej rośnie potrzeba precyzyjnej i szybkiej identyfikacji bakterii na poziomie gatunku w celu zastosowania celowanej i szybkiej terapii. Oprócz powszechnie opisywanych i dobrze poznanych bakterii z gatunku *Staphylococcus aureus*, pozostałe gatunki gronkowców koagulazo-dodatnich oraz dziesiątki koagulazo-ujemnych coraz częściej są groźnymi patogenami, a w rutynowej diagnostyce laboratoryjnej opisywane są wspólnie jako CoNS (ang. coagulase-negative staphylococci) ze względu na nierozróżnialność na poziomie gatunku z użyciem standardowych metod fenotypowych. Rosnąca lekooporność szczepów, a także problemy związane z trudnością hodowania oraz identyfikacją nietypowych szczepów stanowią podstawy do opracowywania nowych narzędzi diagnostycznych opartych na biologii molekularnej. Zarówno metody oparte o łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) oraz o sekwencjonowanie, w tym sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) są metodami odpowiednimi do właściwej identyfikacji bakterii na poziomie gatunku, jednak ich siła dyskryminująca i wiarygodność wyników nadal pozostają niesatysfakcjonujące dla badaczy.

Celem przedstawionej pracy doktorskiej było opracowanie i optymalizacja referencyjnych baz danych dla dwóch nowych metod genetycznych: metody opartej o analizę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) genu *saoC* oraz sekwencjonowania nowej generacji (NGS) regionu 16S-23S rRNA dla 50 opisanych gatunków z rodzaju *Staphylococcus*. Celem pracy było także wyznaczenie kryteriów identyfikacji rodzajowej oraz gatunkowej dla szczepów gronkowcowych z użyciem metody NGS 16S-23S.

W prezentowanej pracy doktorskiej zidentyfikowano na poziomie gatunku wszystkie szczepy z kolekcji, należące do 50 gatunków i 6 podgatunków z rodzaju *Staphylococcus*. W tym celu użyto sekwencjonowania Sangera czterech genów stanowiących podstawę genetycznej identyfikacji gatunkowej gronkowców. W celu precyzyjnej i wiarygodnej identyfikacji gatunkowej, zastosowano sekwencjonowanie Sangera dla genów 16S rRNA, *sodA*, *rpoB* oraz *tuf*. Najwyższą siłą dyskryminującą charakteryzowały się metody oparte o sekwencjonowanie genów *rpoB* i *sodA*, pozwalając na jednoznaczną identyfikację gatunkową wszystkich szczepów w oparciu o różnice nukleotydowe pomiędzy sekwencjami. Z powodu braku sekwencji referencyjnych dla poszczególnych targetów, konieczne było porównanie wyników wszystkich genów dla danego gatunku, w celu ostatecznego potwierdzenia gatunku. Sekwencjonowanie genu 16S rRNA charakteryzowało się najniższą siłą

dyskryminującą, pozwalając na identyfikację zaledwie 74% gatunków. Zastosowanie 4 targetów molekularnych do identyfikacji gatunkowej pozwoliło na wiarygodną identyfikację szczepów, których użyto do dalszych analiz. Uzyskano referencyjne wzory prążkowe genu *saoC* dla 21 szczepów gronkowców, w tym 19 gatunków i 2 podgatunków. Potwierdzono także skuteczność metody RFLP *saoC* na 11 dodatkowych gatunkach, opisanych we wcześniejszych pracach oryginalnych, co ostatecznie pozwoliło na utworzenie referencyjnej bazy wzorów prążkowych genu *saoC* dla 46 gatunków gronkowców. W następnym etapie zastosowano NGS regionu 16S-23S rRNA dla pojedynczego szczepu na każdy gatunek z rodzaju *Staphylococcus*. Metoda NGS 16S-23S charakteryzowała się najwyższą siłą dyskryminującą spośród wszystkich metod użytych w pracy doktorskiej. Metoda NGS 16S-23S pozwoliła na rozróżnienie gatunków: *S. aureus* – *S. argenteus* – *S. schweitzeri*; *S. argensis* – *S. pettenkoferi* – *S. pseudolugdunensis*; *S. pseudintermedius* – *S. intermedius*; *S. piscifermentans* – *S. carnosus* subsp. *carnosus*; *S. capitis* subsp. *urealyticus* – *S. caprae*, co było niemożliwe z użyciem sekwencjonowania genu 16S rRNA. Uzyskane wyniki pozwoliły na opracowanie sekwencji referencyjnych regionu 16S-23S rRNA dla 50 gatunków i 6 podgatunków z rodzaju *Staphylococcus* oraz przyjęcie kryterium identyfikacji rodzajowej gronkowców powyżej 94,1% identyczności sekwencji regionu 16S-23S rRNA, a na poziomie gatunku jeśli najwyższe dopasowanie sekwencji jest równe 99,0% lub wyżej przy jednoczesnej różnicy co najmniej 0,2% (min. 7 nukleotydów) pomiędzy pierwszym i drugim najwyższym dopasowaniem. Analiza bazy danych GenBank wykazała, że dla regionu 16S-23S rRNA dostępne są sekwencje dla 20 gatunków gronkowców, natomiast niniejsza praca doktorska pozwoliła na opracowanie sekwencji referencyjnych dla brakujących 30 gatunków, co stanowi większą część wszystkich gatunków z rodzaju *Staphylococcus*, a tym samym pozwoli na pełne zobrazowanie różnorodności występowania tych bakterii w próbkach klinicznych.

Uzyskane wyniki wskazują, że NGS regionu 16S-23S rRNA może stać się bardzo przydatnym narzędziem używanym w standardowej diagnostyce mikrobiologicznej do identyfikacji bakterii z rodzaju *Staphylococcus* na poziomie gatunku. Można także przewidywać, że metoda ta będzie użyteczna dla innych rodzajów bakterii, w szczególności blisko spokrewnionych z gronkowcami, czyli rodzajami *Streptococcus* i *Enterococcus*. Opracowane bazy sekwencji referencyjnych gronkowców, składające się na pracę doktorską, pozwolą wszystkim laboratoriom posiadającym dostęp do sekwenatorów nowej generacji wykorzystywać technikę NGS regionu 16S-23S rRNA w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej. Zastosowanie sekwencjonowania nowej generacji regionu 16S-23S rRNA jest obiecującym narzędziem do diagnostyki bezhodowlanej, w krótkim czasie, bezpośrednio z próbki od pacjenta oraz do kompleksowej analizy mikrobiomów i ich składu. Natomiast metoda oparta o analizę RFLP genu *saoC* stanowi tańszą alternatywę dla identyfikacji genetycznej gronkowców w próbce, jednak może być zastosowana jedynie do identyfikacji bakterii z rodzaju *Staphylococcus* w czystych hodowlach bakteryjnych.