



GENOTYPOWANIE SZCZEPÓW KLINICZNYCH *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* METODĄ PFGE ORAZ ANALIZY SEKWENCJI MIKROSATELITARNYCH

Katarzyna Roeske^{1*#}, Justyna Cieślik^{2#}, Aleksandra Zasuń¹, Tomasz Jagielski¹, Marta Wróblewska^{2, 3}

¹ Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

² Zakład Mikrobiologii, Centralny Szpital Kliniczny, Uniwersyteckie Centrum Kliniczne Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

³ Zakład Mikrobiologii Stomatologicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Równorzędne autorstwo

WPROWADZENIE

Jednym z najczęściej stosowanych drobnoustrojów probiotycznych są drożdże *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (Sb). Ich prawdopodobny mechanizm probiotyczny opiera się na ograniczaniu adhezji patogenów, wychwycie i neutralizacji wydzielanych przez bakterie chorobotwórcze toksyn oraz indukcji odpowiedzi humoralnej. Dokładna rola Sb w różnych kontekstach klinicznych nie została jeszcze poznana, a bezpieczeństwo ich stosowania jest dyskusyjne z uwagi na obserwowany w ostatnich latach wzrost liczby przypadków fungemii wśród pacjentów z upośledzoną odpornością suplementowanych preparatami zawierającymi Sb.

CEL BADANIA

Przedmiotem badań była ocena zróżnicowania genetycznego szczepów klinicznych *S. cerevisiae* metodą kariotypowania i oznaczania liczby powtórzeń krótkich sekwencji (SSR, Short Sequence Repeats) zawartych w regionach mikrosatelitarnych. Ustalono odległości genetyczne między szczepami klinicznymi a szczepami referencyjnymi Sb pochodzącymi z kolekcji kultur i komercyjnie dostępnych preparatów probiotycznych.

MATERIAŁY I METODY

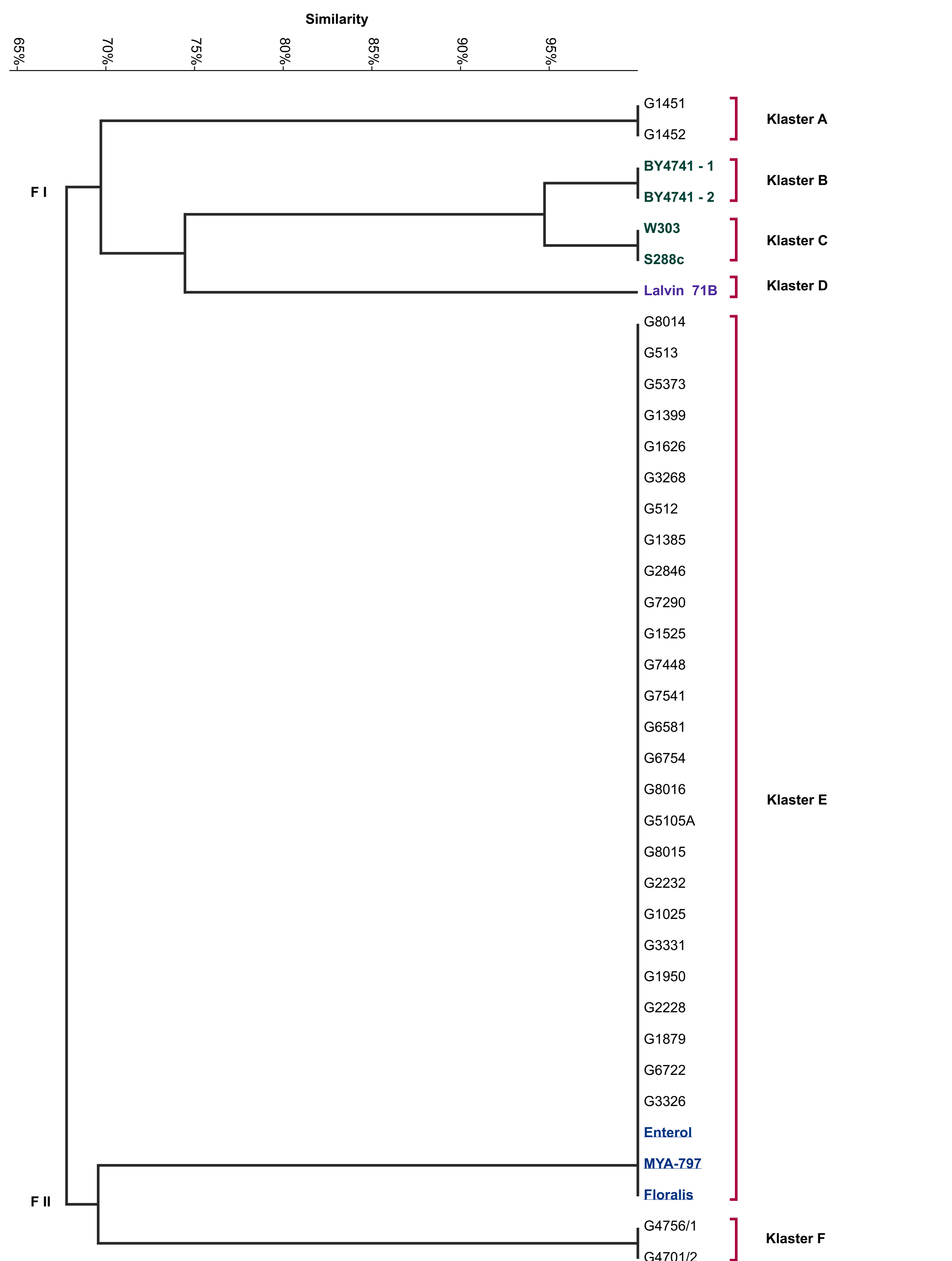
Badanie objęło 50 szczepów klinicznych *S. cerevisiae* wyizolowanych od pacjentów Kliniki Chorób Wewnętrznych, Hematologii i Onkologii oraz Kliniki Chirurgii Ogólnej, Transplantacyjnej i Wątroby SPCSK WUM. Do analizy włączono też 8 szczepów typowych: 4 szczepy laboratoryjne (S288c, BY4741_1, BY4741_2, W303), 1 szczep winiarski (Lalvin 71B) i 3 szczepy probiotyczne, z których dwa wyizolowano bezpośrednio z preparatów handlowych (Enterol 250, Biocodex; Floralis entero, Bellis Pharma), a jeden pochodził z kolekcji kultur (ATCC MYA-797).

Unieruchomiony w bloczkach agarozowych DNA chromosomowy drożdży rozdzielano techniką PFGE w aparacie CHEF Mapper XA (Bio-Rad). Dystans genetyczny szacowano za pomocą współczynnika korelacji Dice'a, a dendrogramy konstruowano stosując algorytm klasteryzacji metodą średnich połączeń (UPGMA) w programie PAST wer. 3.26 (Øyvind Hammer). Do analizy polimorfizmów mikrosatelitarnych zastosowano amplifikację PCR w siedmiu *loci* (YKL172w, YKR072c, YKL139w, YLR177w, YDR289c, YMR057c i region międzygenowy YLR346c-YLR347c), a otrzymane produkty PCR rozdzielano metodą elektroforezy kapilarnej w systemie QIAxcel Advanced (QIAGEN) z wykorzystaniem zestawu QIAxcel High Resolution QX DNA. Określano liczbę SSR w danym *locus*, a wyniki porównywano między szczepami. Mapę cieplną wizualizującą różnice w liczbie SSR oraz wynikającą z nich klasteryzację szczepów wygenerowano stosując współczynnik odległości euklidesowej i hierarchicznego klastrowania metodą średniej grupowej (<http://heatmapper.ca/>).

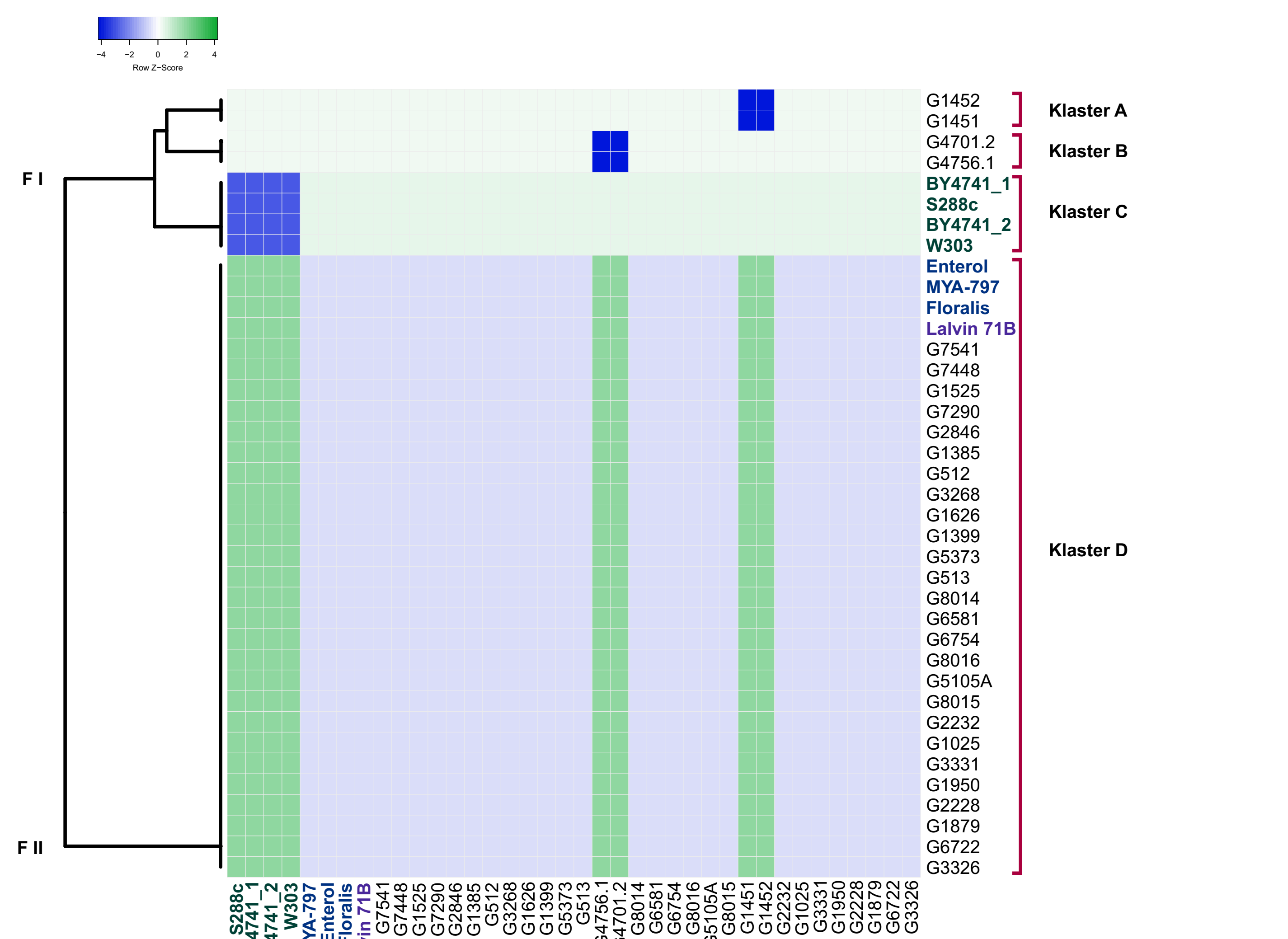
WYNIKI

PFGE. Wszystkie badane szczepy tworzyły 6 klastrow (A-F, 1–29 szczepów w klastrze) i należały do dwóch linii filogenetycznych F I i F II (7 vs. 31 szczepów). Klaster E obejmujący większość (26/30; 87%) szczepów klinicznych włączał też wszystkie badane szczepy typowe Sb (**Rys. 1**).

SSR. Wykazano polimorfizm wszystkich badanych *loci*. W obrębie *locus* identyfikowano 3–9 alleli. Bazując na wynikach testu powtarzalności wykonanego w oparciu o szczep referencyjny S288c, przyjęto, że 2 szczepy są różne, jeśli łączna różnica w liczbie powtórzeń we wszystkich badanych *loci* wynosi 6 lub więcej. Wszystkie szczepy kliniczne lokowały się w 4 klastrach (2–30 szczepów w klastrze) należących do dwóch linii filogenetycznych (F I i F II). Większość (26/30; 87%) szczepów klinicznych, a także probiotyczne szczepy typowe, reprezentowało linię F II (klaster D) (**Rys. 2**).



Rys. 1. Zróżnicowanie profili elektroforetycznych chromosomów 30 szczepów klinicznych (kolor czarny), 3 probiotycznych (kolor niebieski), 4 laboratoryjnych (kolor zielony) i 1 winiarskiego (kolor fioletowy) *S. cerevisiae*. Dystans genetyczny szacowano za pomocą współczynnika korelacji Dice'a, a dendrogramy konstruowano stosując algorytm klasteryzacji metodą średnich połączeń (UPGMA) (współczynnik korelacji kofenetycznej = 0,9945).



Rys. 2. Mapa cieplna wizualizującą różnice w liczbie SSR oraz klasteryzację szczepów klinicznych (kolor czarny), probiotycznych (kolor niebieski), laboratoryjnych (kolor zielony) i winiarskiego (kolor fioletowy) *S. cerevisiae* wygenerowaną przy zastosowaniu współczynnika odległości euklidesowej i hierarchicznego klastrowania metodą średniej grupowej.

WNIOSKI

Genotypowanie 38 szczepów *S. cerevisiae* pozwoliło wyróżnić pięć (PFGE) lub cztery (SSR) grupy genetyczne. Obie metody zgodnie oddzieliły 4 (G1451, G1452, G4756.1, G4701.2) od pozostałych 26 szczepów klinicznych. Te 4 szczepy sklasyfikowano do odrębnej linii filogenetycznej obejmującej również szczepy laboratoryjne przy zastosowaniu metody typowania mikrosatelitarnego. Kariotypowanie PFGE wydzieliło jedynie dwa z nich (G1451, G1452). Obie metody zgodnie przypisały większość (28/30, 93% PFGE vs. 26/30, 87% SSR) szczepów klinicznych do tej samej linii ewolucyjnej, co

Dane kontaktowe:
dr Katarzyna Roeske
Uniwersytet Warszawski
Instytut Mikrobiologii
Zakład Mikrobiologii Stosowanej
ul. I. Miecznikowa 1, Warszawa
tel. (22) 55 41 311
e-mail: kroeske@biol.uw.edu.pl

Projekt finansowany przez Uniwersytet Warszawski i Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach programu „Strategia doskonałości”