

Wzrastająca liczba osób cierpiących na cukrzycę stanowi poważny problem dotyczący system opieki zdrowotnej na całym świecie, zważywszy, że uznawana jest ona za główny czynnik ryzyka rozwoju infekcji stopy. Szacuje się, że u połowy pacjentów z cukrzycowym owrzodzeniem stopy dochodzi do rozwoju zakażenia (*ang. diabetic foot infection, DFI*), które rodzi poważne konsekwencje zdrowotne, w tym konieczność dłuższej hospitalizacji, ogólnie niską jakość życia pacjentów, wysokie ryzyko amputacji kończyn dolnych czy nawet śmierć. Diagnostyka oraz dobór skutecznej antybiotykoterapii DFI stanowi obecnie poważne wyzwanie zarówno dla klinicystów jak i naukowców na całym świecie ze względu na szerokie spektrum potencjalnych patogenów biorących udział w rozwoju DFI, długą listę potencjalnych czynników związanych ze stanem zdrowia pacjenta, często wielobakteryjny charakter zakażeń oraz zwiększający się udział szczepów lekoopornych. Doniesienia literaturowe wskazują na często niską skuteczność podejmowanych antybiotykoterapii DFI wynikających ze złej diagnozy czynnika chorobotwórczego. Stosowane do tej pory konwencjonalne oraz molekularne techniki identyfikacji mikroorganizmów najczęściej nie umożliwiają podjęcia optymalnych środków leczenia ze względu na takie czynniki jak m.in. znaczny czas potrzeby do uzyskania wyników, zawężone spektrum identyfikowanych gatunków, trudność w rozróżnianiu bliskospokrewnionych szczepów czy też ograniczoną możliwość detekcji antybiooporności. Uważa się, że rozwiązaniem tych problemów może być wykorzystanie techniki desorpcji/ionizacji laserem wspomaganej matrycą sprzężonej ze spektrometrią mas z analizatorem czasu przelotu (MALDI-TOF/MS), która jak dotąd nie znalazła szerszego zastosowania w monitorowaniu i kontroli zakażenia stopy cukrzycowej. W związku z powyższym, celem zaplanowanych w projekcie prac badawczych będzie zaadaptowanie techniki MALDI-TOF/MS do szybkiej diagnostyki DFI poprzez stworzenie nowych protokołów i procedur analitycznych dla wszystkich etapów procesu rozpoznania podłoża przyczynowego DFI począwszy od pobierania, transportowania i przechowywania próbek po hodowlę mikroorganizmów, ich identyfikację oraz detekcję antybiooporności.

Aby zrealizować założony cel badawczy przeprowadzone zostaną następujące badania: (1) dobór optymalnych warunków hodowli mikroorganizmów związanych z rozwojem DFI z wykorzystaniem szczepów wzorcowych oraz selekcji podłoża mikrobiologicznych dedykowanych różnym grupom mikroorganizmów; (2) dobór różnych parametrów procedur przygotowania próbek i warunków analizy MALDI-TOF/MS w kontekście ich wpływu na skuteczność identyfikacji szczepów wzorcowych w trybie całych komórek oraz ekstrakcji białek uwzględniająca m.in. dobór różnych rodzajów matryc, metod otrzymywania ekstraktów komórkowych oraz markerów antybiooporności; (3) opracowanie protokołów dla procedury identyfikacji mikroorganizmów za pomocą technik biologii molekularnej jako metody odniesienia z wykorzystaniem reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) oraz sekwencjonowania DNA różnych regionów genomu bakteryjnego w tym genów odpowiedzialnych za lekooporność; (4) badanie wpływu sposobu pobierania, transportowania i warunków przechowywania próbek pochodzących od pacjentów cierpiących na DFI na końcowy wynik identyfikacji mikroorganizmów oraz (5) analiza składu mikrobiologicznego próbek pochodzących od różnych grup pacjentów za pomocą ustalonych protokołów dla MALDI-TOF/MS oraz referencyjnych metod molekularnych z oceną m.in. wpływu parametrów zdrowotnych pacjentów oraz podjętych antybiotykoterapii.

Stworzenie nowej procedury analitycznej przyczyni się do poszerzenia wiedzy na temat mikrobiologicznego podłoża powstawania i rozwoju zakażenia stopy cukrzycowej, w tym udziału szczepów lekoopornych, a także poszerzy wiedzę na temat możliwości zastosowania techniki MALDI-TOF/MS jako narzędzia do szybkiej diagnostyki DFI, również w kontekście rutynowych laboratoriów klinicznych.