

Warszawa, 06.03.2025

Autor rozprawy doktorskiej: **Sylwia Magdalena Berus**

Promotor: **prof. dr hab. Agnieszka Kamińska**

Temat rozprawy doktorskiej: **Detekcja mikroorganizmów w próbkach klinicznych metodą powierzchniowo wzmocnionej spektroskopii Ramana**

Streszczenie

Niniejsza rozprawa doktorska przedstawia serię badań przeprowadzonych w celu znalezienia spektralnego obrazu wybranych jednostek chorobowych z wykorzystaniem powierzchniowo wzmocnionej spektroskopii Ramana (*ang.* Surface-enhanced Raman spectroscopy – SERS) oraz metod chemometrycznych. Analiza SERS została wykonana w wariancie bezznacznikowym (tzw. label-free) w którym informacje o zmianach spektralnych wywoływanych danym typem infekcji pochodzą wprost z zarejestrowanego sygnału SERS próbki klinicznej. Procedura oparta na braku konieczności użycia odczynników oraz dodatkowej modyfikacji analitu pozwala zmniejszyć ryzyko popełnianych błędów oraz ograniczyć nakład pracy i czasu.

W ramach przeprowadzonych badań opracowano procedurę przygotowania próbek klinicznych oraz ustalono warunki pomiarowe analiz SERS z wykorzystaniem uprzednio zoptymalizowanych nanostruktur plazmonicznych. Istotnym elementem pracy była również kompleksowa charakterystyka spektralna grupy kontrolnej i eksperymentalnej pod kątem rozważanej jednostki chorobowej. Analiza otrzymanych widm z wykorzystaniem metod chemometrycznych zapewniła wgląd w korelację między danymi oraz identyfikację pasm markerowych mających znaczenie diagnostyczne. Na podstawie odpowiednio zdefiniowanych klas stworzono również modele kalibracyjne, których wydajność przetestowano na etapie walidacji zewnętrznej symulującej rzeczywiste warunki diagnostyki.

Pierwszą część badań poświęcono analizie SERS bakterii z rodzaju *Neisseria* spp., oraz wymazom z cewki moczowej w kierunku rozpoznawania chorób wenerycznych. Uzyskane dane stanowiły katalog widm SERS mikroorganizmów (dane referencyjne). Następnie na tej podstawie wyhodowany z próbki klinicznej szczep został poprawnie zidentyfikowany jako *Neisseria gonorrhoeae* wykorzystując jego unikatowy obraz spektralny (tzw. „odcisk palca”). W analizie

wymazów z cewki moczowej grupa badana wykazała odmienny charakter spektralny względem grupy kontrolnej w całym analizowanym zakresie. Pojawienie się nowych pasm (szczególnie 724 cm^{-1}) wskazało na zdecydowany udział patogenów w tworzenie sygnału SERS. Stanowi to podstawę do rozpoznawania infekcji wprost z widm SERS próbek klinicznych. Dla utworzonych modeli kalibracyjnych otrzymano wysoką dokładność w klasyfikacji próbek zewnętrznych tj.: 89 % dla SIMCA oraz 100 % dla PLS-DA.

Kolejny rozdział pracy dotyczy spektralnej charakterystyki grzybów z rodzaju *Candida* spp., a także bakterii mających szczególne znaczenie dla rozwoju infekcji intymnych. Zarejestrowane sygnały SERS mikroorganizmów prezentują udział poszczególnych składników obecnych w ich strukturze np.: chityna, glukagon oraz mannoproteiny dla *Candida* spp. oraz lipidy, fosfolipidy, proteiny dla bakterii. Analizie SERS zostały również poddane próbki kliniczne dla których zaobserwowano zmienność spektralną powstałą na skutek zaburzeń w obrębie mikroflory i biochemii wymazu. Na tej podstawie ustalono grupę kontrolną stanowiącą doskonałą podstawę dla rozpoznawania infekcji VVC z widm SERS analizowanej próbki. Metoda PLSR wskazała na istnienie wyraźnych różnic między dwiema analizowanymi klasami. Pozwoliła również ustalić pasma markerowe, które zidentyfikowano jako te należące do mikroorganizmów ($727, 1003, 1125, 1258, 1331, 1455$ oraz 1670 cm^{-1}) oraz składników wymazów tj.: aminokwasy, białka, sacharydy, kwas mlekowy ($669, 891$ oraz 1047 cm^{-1}).

Trzecia część badań dotyczy analizy śliny i wymazów z nosogardzieli w aspekcie rozpoznawania infekcji COVID-19. Zastosowane metody chemometryczne pozwoliły na wydobycie różnicującej informacji spektralnej – dla śliny CoV(+) odnotowano podwyższony poziom metioniny, kwasów nukleinowych DNA/RNA, białek (np.: ferrytyna) oraz immunoglobulin, a dla wymazów z nosogardzieli CoV(+) zaobserwowano istotny wpływ neopteryny. Spośród testowanych metod z nadzorem, SVMC zapewniła najlepszą klasyfikację próbek zewnętrznych osiągając dokładność 90 % oraz czułość 100 % dla analiz śliny, a także dokładność 75 % oraz czułość 88 % dla wymazów z nosogardzieli.

Wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej wskazują, że technika SERS w połączeniu z metodami chemometrycznymi jest konkurencyjnym rozwiązaniem diagnostycznym dla metod obecnie przyjętych. Warto również zaznaczyć, że badania zostały wykonane przy użyciu

przenośnego spektrometru Ramana, co stanowi ogromną zaletą dla diagnostyki wykonywanej w punkcie opieki.