

Przydatność testu cytometrycznego do oceny żywotności i liczby bakterii nieprzetrawialnych. Dostosowanie metody do oceny przetrwalników bakteryjnych i grzybów

Edyta Ochnik

Promotor i opiekun pracy: dr hab. Anna Stelmaszyk-Emmel

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Wieku Rozwojowego WUM

WPROWADZENIE

Liczne mechanizmy chorobotwórczości oraz powszechność występowania bakterii i grzybów zmuszają do jak najdokładniejszej analizy mikrobiologicznej badanych materiałów. Za szczególnie niebezpieczne możemy uznać bakterie przetrwalnikujące (np. rodzaje *Clostridium* czy *Bacillus*), które w niekorzystnych warunkach środowiskowych mogą produkować przetrwalniki. Formy te potrafią, w stanie swoistego „uśpienia” przetrwać nawet kilka lat. Dodatkowo wykazują one znaczną oporność na większość środków dezynfekcyjnych. Wymagając specjalnych metod sterylizacji, stanowią poważny problem w medycynie oraz w wielu gałęziach przemysłu. Za równie poważny problem możemy uznać stany VBNC (ang. viable but not culturable) drobnoustrojów. Szybki rozwój mikrobiologii powoduje, że poszukuje się jak najszybszych i jak najczulszych metod analizy stanów funkcjonalnych drobnoustrojów. Za jedną z takich metod możemy uznać cytometrię przepływową, która w połączeniu z barwnikami fluorescencyjnymi pozwala na klasyfikację oraz określenie liczby komórek zawieszonych w płynie. Klasyfikacja ta odbywa się na podstawie przenikalności barwników przez uszkodzone błony komórkowe mikroorganizmów.

CEL PRACY

Przedstawienie cytometrii przepływowej jako szybkiej i skutecznej metody służącej do określania liczebności oraz stanów funkcjonalnych drobnoustrojów wykonując:

1. ocenę przydatności testu cytometrycznego LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability and Counting Kit do analizy żywotności i liczby różnych, najczęściej wykrywanych w materiale biologicznym od pacjentów, bakterii nieprzetrawialnych

2. dostosowanie testu LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability and Counting Kit do wykrywania przetrwalników bakteryjnych na przykładzie gatunku *Clostridium difficile*

3. dostosowanie testu LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability and Counting Kit do oceny żywotności i liczby grzybów *Candida albicans*

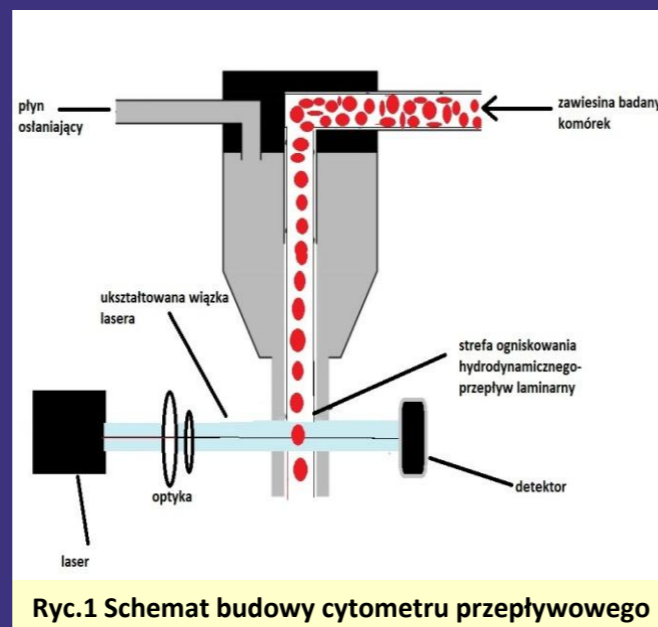
MATERIAŁY I METODY

Materiałem były szczepy bakterii oraz grzybów wyizolowane od pacjentów Szpitala Pediatricznego WUM. Dla każdego poszczególnego szczepu wykonano zawiesiny w 0,9% roztworze NaCl.

1. Wykorzystane gatunki bakterii nieprzetrawialnych:
Staphylococcus aureus
Staphylococcus epidermidis
Enterococcus faecium
Enterococcus faecalis
Escherichia coli
Klebsiella pneumoniae
Bacteroides fragilis



Fot.1 Cytometr przepływowy LSR Fortessa BD



Ryc.1 Schemat budowy cytometru przepływowego

2. Wykorzystany gatunek bakterii przetrwalnikujących:
Clostridium difficile

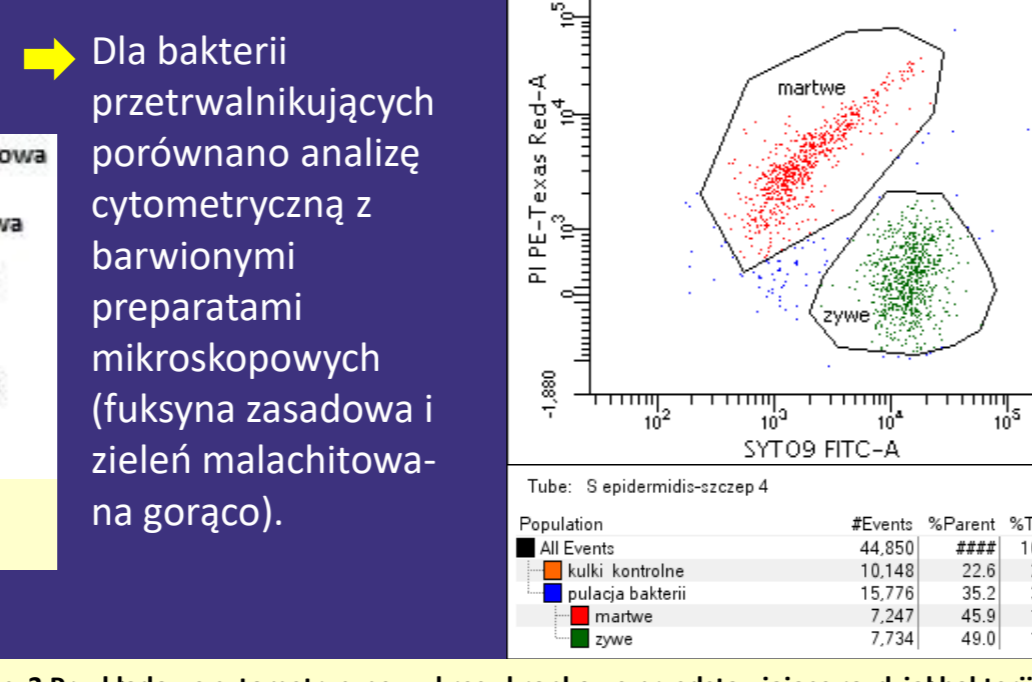
We wszystkich 3 etapach wykorzystano test cytometryczny LIVE/DEAD BacLight, który zawiera dwa barwniki kwasów nukleinowych: SYTO9 - wykazuje fluorescencję zieloną, przenika do wnętrza wszystkich komórek, niezależnie od stanu błon oraz jodek propidyny (PI) - wykazuje fluorescencję czerwoną, wnika tylko do komórek z uszkodzonymi błonami. Wystandaryzowane kulki kontrolne służą jako odnośnik do liczenia komórek.

3. Wykorzystany gatunek grzyba:
Candida albicans

- W celu zabicia bakterii i grzybów traktowano je 70% alkoholem izopropylowym.
- Analizy cytometryczne dokonywano na Cytometrze LSR Fortessa BD- ustawiono kompensację, bramkowano, wyznaczano średnią wartości fluorescencji oraz współczynniki zmienności (Cv%) dla każdego gatunku w każdej populacji w kanałach FITC i PE Texas Red.



Ryc. 2 Schemat barwienia przetrwalników (przetrwalniki-zielone, komórki wegetatywne-czerwone).

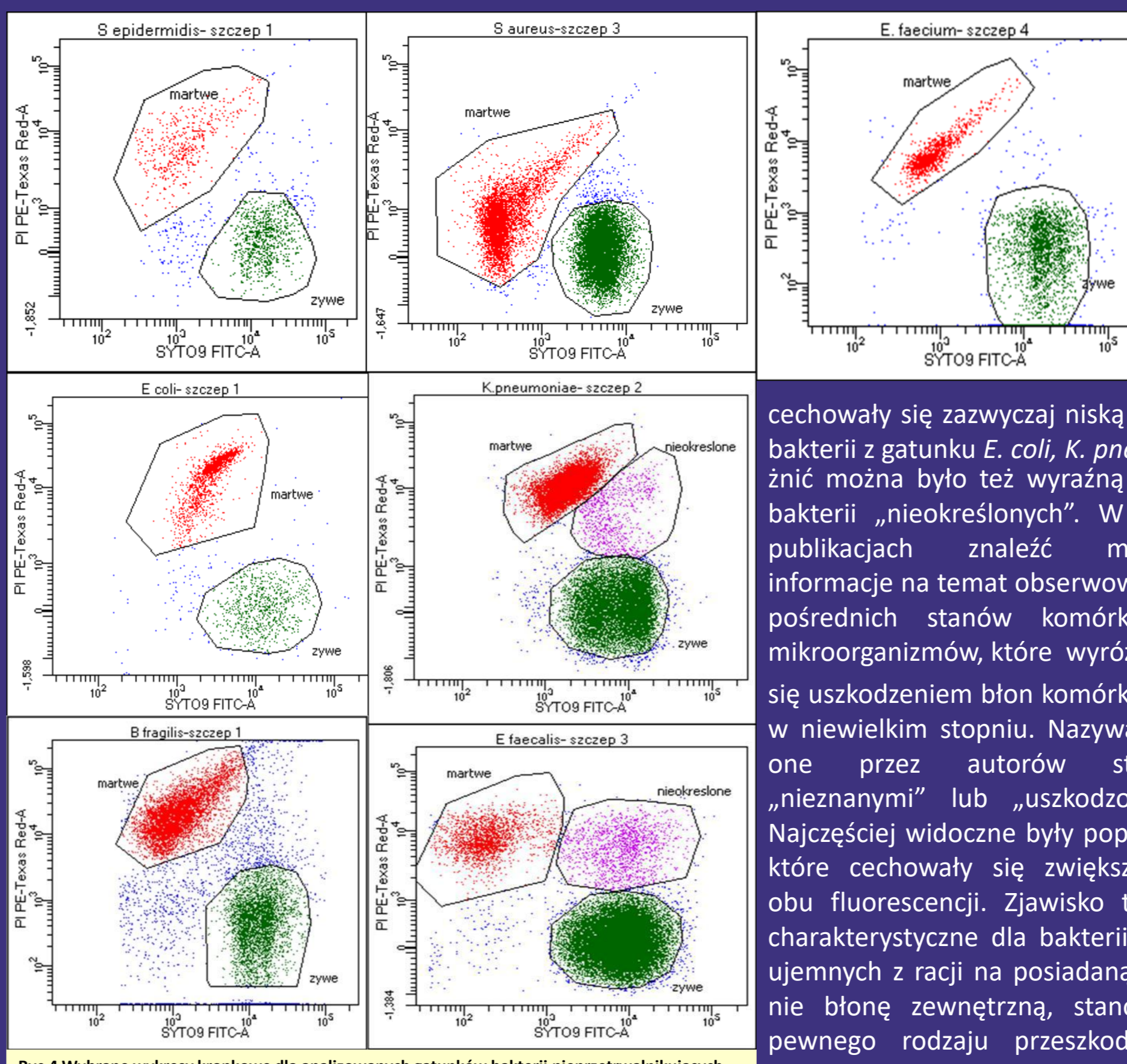


Ryc. 3 Przykładowe cytometryczne wykresy kropkowe przedstawiające rozdzielanie bakterii z gatunku *S.epidermidis* na poszczególne populacje- bramkowanie (wykres własny).

Test cytometryczny LIVE/DEAD BacLight oprócz oceny żywotności komórek bakteryjnych daje również szansę na ich szybkie policzenie. Pomocny w liczeniu wzór ma postać:

$$\text{liczba bakterii/ml} = \frac{\text{liczba zdarzeń w bramce} \times \text{współczynniki rozcieńczenia}}{\text{liczba zdarzeń w bramce mikrosfer} \times 10^{-6}}$$

WYNIKI

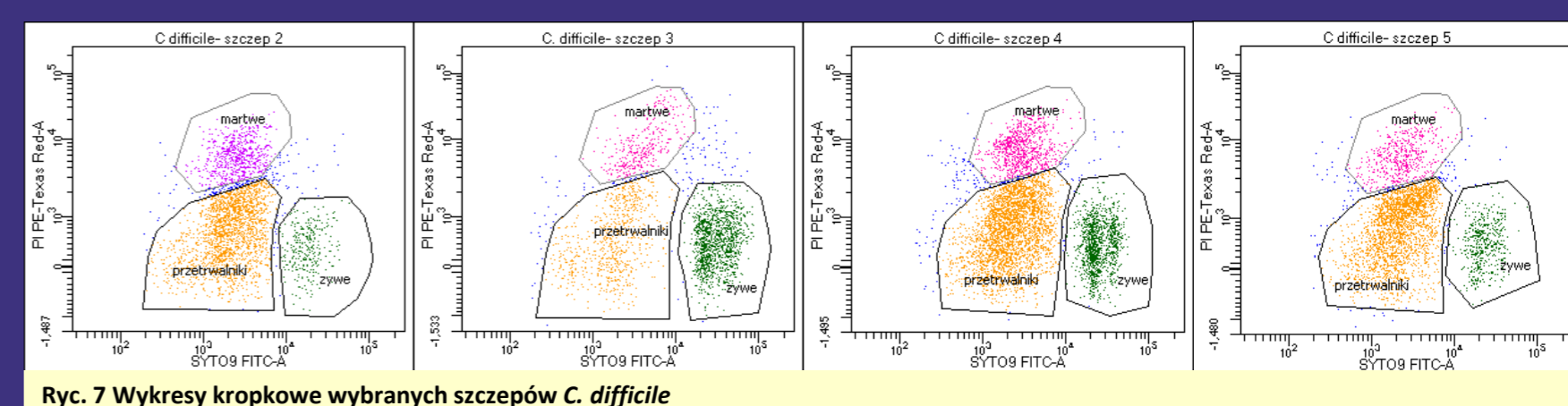


Ryc.4 Wybrane wykresy kropkowe dla analizowanych gatunków bakterii nieprzetrawialnych

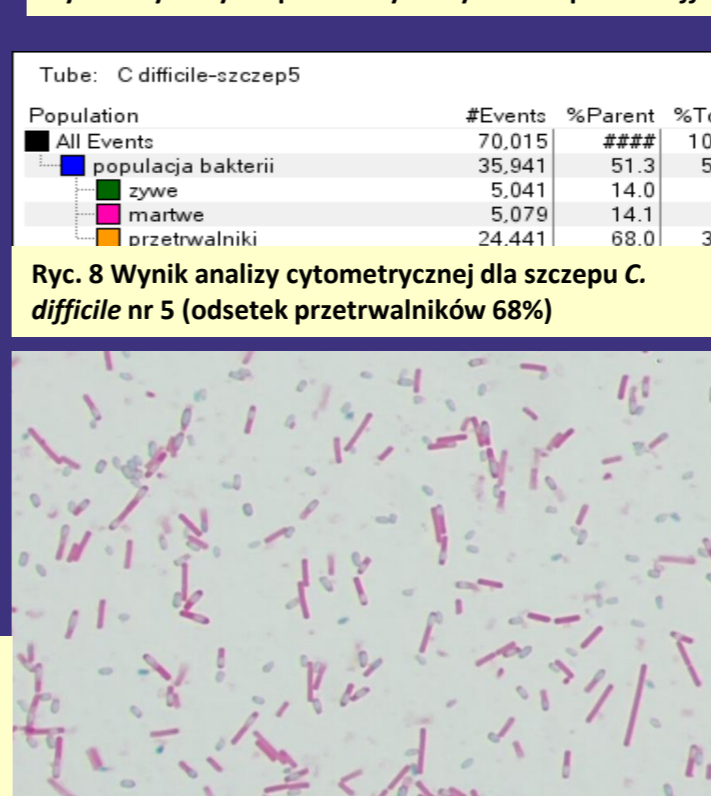
populacji żywych bakterii na wykresie cytometrycznym zaś może mieć związek z fazą wzrostu drobnoustroju, a także z dostępem do składników odżywczych. Ułożenie takie charakterystyczne jest dla bakterii zagłodzonych, z niedokończonymi podziałami redukcyjnymi. W naszych badaniach wyraźną heterogenność populacji żywych zaobserwować można było dla gatunków *S. epidermidis*, *B. fragilis*, *E. faecium* oraz *E. faecalis*.

Clostridium difficile

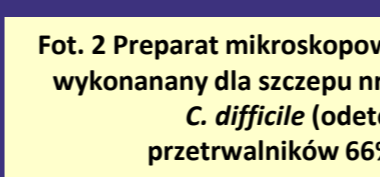
W naszych badaniach oprócz komórek żywych i martwych gatunku *C. difficile* w każdej próbce dostrzec można było wyraźną trzecią grupę cechującą się niską fluorescencją obu stosowanych przez nas barwników, co skłoniło do zastanowienia się nad przetrwalnikami. Odsetek zdarzeń w bramce nie różnił się znacząco od odsetka przetrwalników zaobserwowanych w barwionym preparacie liczonym za pomocą mikroskopu. Uzyskano korelację wyników obu metod w teście Spaermanna oraz przy użyciu metody graficznej- wykresu Blanda-Altmana.



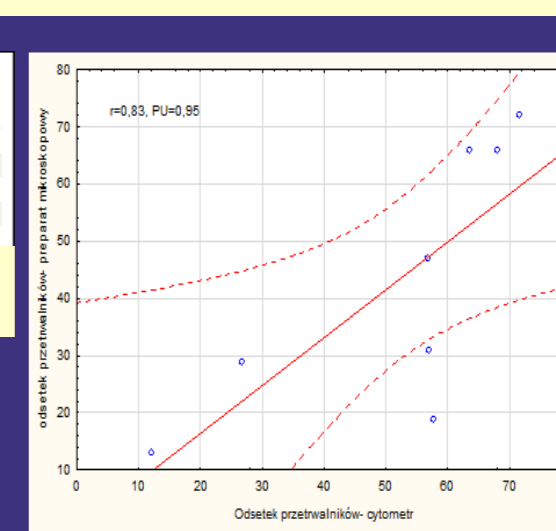
Ryc. 7 Wykresy kropkowe wybranych szczepów *C. difficile*



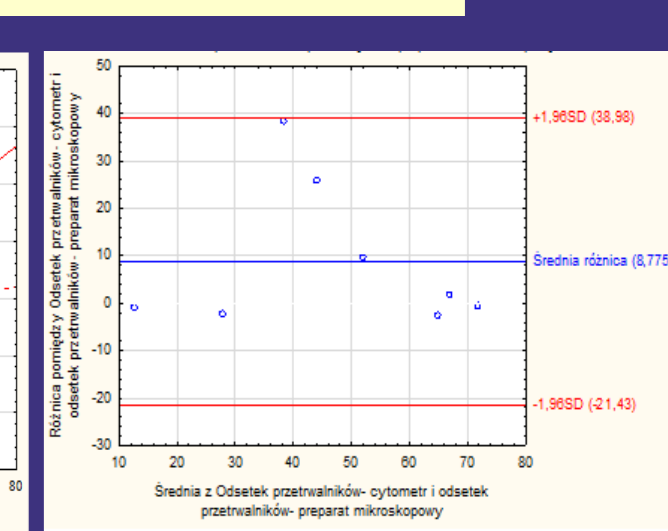
Ryc. 8 Wynik analizy cytometrycznej dla szczepu *C. difficile* nr 5 (odsetek przetrwalników 68%)



Fot. 2 Preparat mikroskopowy wykonany dla szczepu nr 5 *C. difficile* (odsetek przetrwalników 66%)



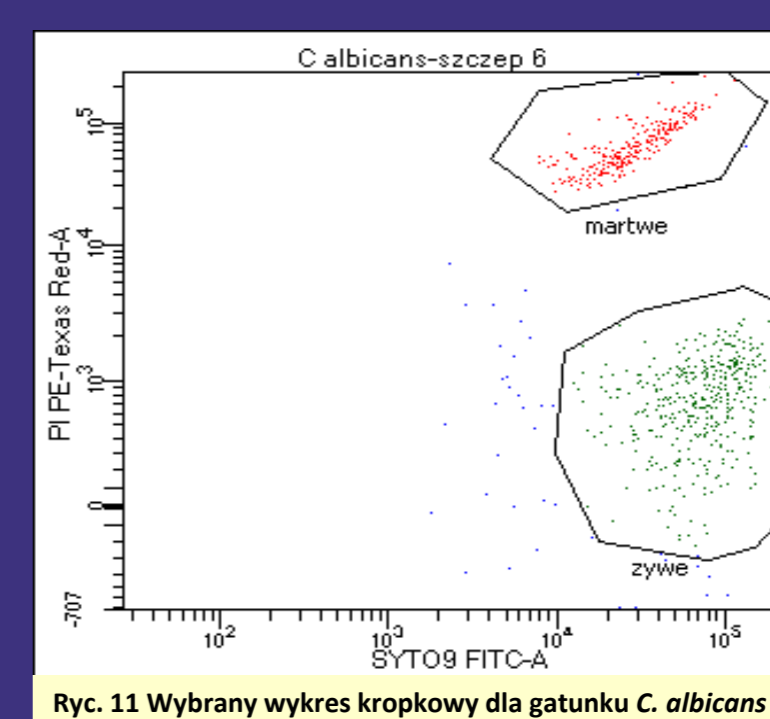
Ryc. 9 Korelacja między odsetkami przetrwalników obliczonymi przez analizę cytometryczną oraz policzonymi w preparacie mikroskopowym.



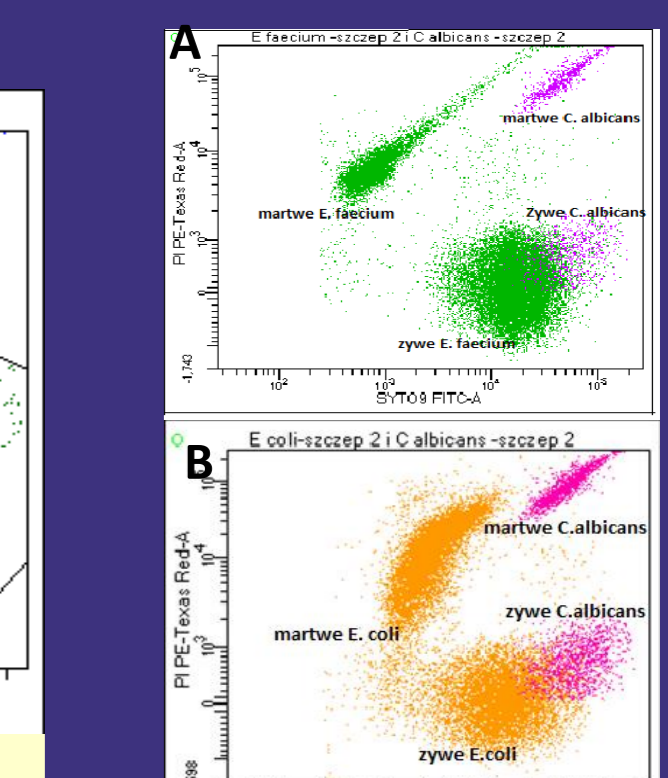
Ryc. 10 Wykres Blanda-Altmana porównujący odsetek przetrwalników policzonych metodą analizy cytometrycznej oraz liczenia w preparacie mikroskopowym.

Candida albicans

Dzięki zmianie napięcia na detektorach cytometru można było zaobserwować i wyodrębnić interesujące nas populacje: żywą i martwą. Zmiana napięć na detektorach podyktowana była większym rozmiarem komórek *Candida* w stosunku do komórek bakteryjnych, dla których przeznaczony jest test i nie wpływała na ustawienia kompensacji oraz odczytu fluorescencji. Wszystkie badane szczepy charakteryzowały się podobnym ułożeniem sygnałów na wykresie. Wyniki MFI dla obu kanałów zarówno dla populacji martwej jak i żywej cechowały się niską zmiennością. Warty uwagi jest również fakt ułożenia martwej populacji tego grzyba na wykresach kropkowych. W porównaniu z bakteriami martwa populacja *C. albicans* cechuje się zwiększoną zieloną fluorescencją.



Ryc. 11 Wybrany wykres kropkowy dla gatunku *C. albicans*



Ryc. 12 Wykresy zbiorcze porównujące położenie populacji wybranych gatunków bakterii i *C. albicans*. (A- *E. faecium*, B- *E. coli*)

WNIOSKI

- Za pomocą cytometrii przepływowej, używając testu LIVE/DEAD BacLight możliwe jest rozróżnienie, ocena oraz wylczenie liczby żywych i martwych drobnoustrojów w badanej próbce. Każdy gatunek uклада się w nieco innym miejscu na wykresie dwuwymiarowym, co pozwala wstępnie podejrzewać jakie gatunki mogą być obecne w mieszaninie. Metoda nie zastąpi pełnej identyfikacji drobnoustrojów za pomocą systemów mikrobiologicznych, ale może naprowadzić badającego na odpowiedni tor analizy, co znacznie przyspieszy czas od przyjęcia materiału do wydania wyniku.
- Wykorzystanie cytometrii oraz barwników fluorescencyjnych w teście LIVE/DEAD BacLight daje szansę na wykrycie przetrwalników bakteryjnych w badanej próbce. Po porównaniu wyników uzyskanych metodą cytometrii z wynikami liczenia mikroskopowego możemy ocenić metody jako zgodne, mimo to należałoby wykonać więcej prób, aby potwierdzić, że test jest odpowiednio dostosowany do analizy odsetka przetrwalników. Metoda może okazać się przydatna w monitorowaniu czystości mikrobiologicznej, kontroli procesów dezynfekcji, wyjąławiania, a także w poznawaniu mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie form odpornych na zabijanie.
- Za pomocą testu LIVE/DEAD BacLight możemy analizować nie tylko bakterie, ale również gatunek grzyba *Candida albicans*. Musimy pamiętać jedynie o zmianie wartości napięć na detektorach (SSC i FSC) z uwagi na większe rozmiary komórek grzyba w stosunku do komórek bakteryjnych. Pozostałe etapy analizy wyglądają identycznie jak w przypadku bakterii.

PIŚMIENNICTWO

Baj J. Mikrobiologia, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2018, 15-127.
 Berney M, Hammes F, Bosshard F. „Assessment and Interpretation of Bacterial Viability by Using the LIVE/DEAD BacLight Kit in Combination with Flow Cytometry.” *Applied and environmental microbiology*, 2007, 73:3283–3290.
 LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability and Counting Kit- Instrukcja wykonania testu, 2004.
 BD, LSR Fortessa, Cell Analyzer User's Guide, 2010.
 Schaeffer. „A simplified method of staining endospores.” *Science*, 1933.
 Barbetti S, Citterio S, Labra M, Baroni M, Neri M. „Two- and three-color fluorescence flow cytometric analysis of immunoidentified viable bacteria.” *Cytometry*, 2000, 40:214-218.
 Berney M, Weilenmann H. „Flow-cytometric study of vital cellular functions in *Escherichia coli* during solar disinfection.” *Microbiology*, 2006, 152:1719-1729.
 Jaeger H, Schulz A, Karapetkov N, Knorr D. „Protective effect of milk constituents and sublethal injuries limiting process effectiveness during PEF inactivation of *Lb. rhamnosus*.” *Int. J. Food Microbiol.*, 2009, 134:154-61
 Lehtinen J, Nuutila J, Lilius E. „Green fluorescent protein-propidium iodide (GFP-PI) based assay for flow cytometric measurement of bacterial viability.” *Cytometry A*, 2004, 60:165-72.