



Warszawa, 21 września 2016

Jedna bakteria wystarcza do zidentyfikowania natury choroby

Diagnoza: zapalenie opon mózgowych. Lecz jaka jest przyczyna konkretnego przypadku? Nowe techniki analizy płynu mózgowo-rdzeniowego, opracowane i przetestowane w Instytucie Chemii Fizycznej PAN w Warszawie, pozwalają w niecały kwadrans zdiagnozować bakteryjne podłoże choroby i na podstawie zaledwie jednej komórki bakterii ustalić gatunek intruza.

Za wywołanie zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych mogą odpowiadać różne czynniki. Im szybciej lekarz zdobędzie wiedzę o przyczynie konkretnego przypadku, tym wcześniej będzie w stanie dopasować właściwą terapię i zapobiec eskalacji choroby, nierzadko prowadzącej do śpiączki lub śmierci pacjenta. Dotychczasowe metody analizy nie ułatwiały zadania: wymagały na przykład prób namnażania bakterii, co trwało nawet kilkadziesiąt godzin. Okazuje się, że czas analizy można skrócić do mniej niż kwadransa! Szybka i pewna diagnoza zakażeń bakteryjnych stała się realna dzięki nowym technikom badania płynu mózgowo-rdzeniowego, opracowanym w Instytucie Chemii Fizycznej PAN (IChF PAN) w Warszawie. Do przeprowadzenia pomiaru jest potrzebna próbka płynu o objętości zaledwie mikrolitra, w której wystarczy znaleźć jedną bakterię, żeby zidentyfikować gatunek odpowiedzialny za rozwój choroby.

W IChF PAN od dłuższego czasu trwają prace służące upowszechnieniu niezwykle czułej techniki analizy: wzmacnianej powierzchniowo spektroskopii ramanowskiej (SERS, czyli Surface-Enhanced Raman Spectroscopy). Głównym mechanizmem fizycznym, leżącym u podstaw tej techniki, jest znane od kilkadziesiąt lat nieelastyczne rozpraszanie fotonów.

Zwykle gdy cząsteczka pochłonie foton, od razu emituje inny, o tej samej energii – takie rozpraszanie określa się jako elastyczne. Zdarza się jednak, że część energii pochłoniętego fotonu zostanie przekazana na wzbudzenie drgań lub obrotów cząsteczki i wtedy wyemitowany foton będzie miał nieco mniejszą energię. Może też zajść sytuacja odwrotna: wyemitowany foton będzie miał energię nieco większą, bo cząsteczka przekaże mu nadmiar energii rotacyjnej lub oscylacyjnej. Rozpraszanie nieelastyczne jest rzadkim zjawiskiem, ulega mu zaledwie jeden foton na dziesiątki milionów. To dlatego w normalnych warunkach sygnały z rozpraszania ramanowskiego są bardzo trudne do zarejestrowania.

„Sytuacja zmienia się dramatycznie, gdy cząsteczkę umieścimy na odpowiednio schropowanej powierzchni. Okazuje się, że cząsteczki znajdujące się na krawędziach czy szczytach nierówności

znacznie chętniej rozpraszają fotony właśnie nieelastycznie. Sygnał rozpraszania ramanowskiego jest wtedy wzmacniany od miliona do miliarda razy i możemy go bez większych problemów zaobserwować. Efekt ten jest znany od połowy lat 70. ubiegłego wieku”, wyjaśnia dr Agnieszka Kamińska (IChF PAN).

We współpracy z Instytutem Fizyki PAN w Warszawie, IChF PAN opracował specjalne podłoża z tlenku cynku, przeznaczone do prowadzenia badań za pomocą widm ramanowskich. Podłoża wykorzystano do pomiarów metodą SERS stężeń neopteryny w próbkach płynu mózgowo-rdzeniowego, udostępnionych przez Narodowy Instytut Leków (NIL) w Warszawie, a pochodzących od pacjentów z wcześniej zdiagnozowanym zapaleniem opon mózgowych. Wykryte stężenie neopteryny okazało się dziesięciokrotnie wyższe niż w próbce referencyjnej, pobranej od zdrowej osoby.

„Podwyższone stężenie neopteryny to cenna informacja, że organizm walczy z chorobą o podłożu bakteryjnym. Jednak zapalenie opon mózgowych może być efektem zakażenia różnymi gatunkami bakterii. Żeby działać naprawdę efektywnie, lekarz powinien wiedzieć, z którym gatunkiem ma właśnie do czynienia”, mówi dr hab. Anna Skoczyńska, prof. NIL.

Pomiary widm ramanowskich bakterii w płynie mózgowo-rdzeniowym okazały się trudne: w przeciwieństwie do cząsteczek chemicznych, które nie przemieszczają się po podłożu, bakterie znajdują się w ciągłym ruchu. Przed naukowcami pojawiło się wyzwanie: należało opracować podłoża, które nie tylko zapewnią wzmocnienie sygnału ramanowskiego, ale także odfiltrują bakterie z płynu oraz skutecznie je unieruchomią na czas pomiaru. Rozwiązaniem okazały się tanie, komercyjnie dostępne maty tkane, pokrywane w IChF PAN cienką warstwą stopu złota i srebra (jej grubość to ok. 70-80 nanometrów). Przez układ kilku takich mat, o malejących porach, przepuszczano strumień płynu mózgowo-rdzeniowego podawany przez pompę strzykawkową. Gdy bakteria docierała do maty o zbyt małych oczkach, grzęzła w jednym z nich, a odpowiednio dobrana prędkość przepływu strumienia płynu uniemożliwiała jej zmianę położenia.

„Przetestowaliśmy nasze podłoża na trzech gatunkach bakterii wywołujących zapalenie opon mózgowych: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* i *Haemophilus influenzae*. Poprawnie wykrywaliśmy ich obecność w 95% przypadków, a gatunek identyfikowaliśmy z pewnością sięgającą 98%. A ponieważ mówimy o niezwykle czułej spektroskopii ramanowskiej, do otrzymania tak precyzyjnych wyników wystarczyło nam znalezienie jednej komórki bakteryjnej!”, podkreśla dr Kamińska.

Cały przebieg analizy jest w znacznym stopniu zautomatyzowany i do minimum ogranicza kontakt laboranta z badaną próbką. W celu przeprowadzenia pomiaru należy jedynie pobrać pod wyciągiem laminarnym mikrolitrową porcję płynu mózgowo-rdzeniowego do strzykawki, a następnie tę umieścić w pompie strzykawkowej podłączonej do spektrometru Ramana. W celu zwiększenia pewności pomiaru zarejestrowane sygnały są przetwarzane przez oprogramowanie korzystające z zaawansowanych metod statystycznych i obsługującemu pozostaje jedynie odczytać wynik.

W stosunku do dotychczasowych metod, rozwiązanie zaproponowane przez IChF PAN ma szereg zalet: wymaga niewielkich ilości płynu mózgowo-rdzeniowego, eliminuje konieczność długotrwałego namnażania bakterii, automatyzacja pomiaru gwarantuje wysoki poziom bezpieczeństwa, a wynik jest dostępny w ciągu minut. Istotnym argumentem jest także cena: zakup sprzętu niezbędnego do przeprowadzenia analizy nie przekracza kilkudziesięciu tysięcy dolarów, leży więc w zasięgu możliwości finansowych nawet małych placówek medycznych.

Instytut Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk (<http://www.ichf.edu.pl/>) został powołany w 1955 roku jako jeden z pierwszych instytutów chemicznych PAN. Profil naukowy Instytutu jest silnie powiązany z najnowszymi światowymi kierunkami rozwoju chemii fizycznej i fizyki chemicznej. Badania naukowe są prowadzone w dziewięciu zakładach naukowych. Działający w ramach Instytutu Zakład Doświadczalny CHEMIPAN wdraża, produkuje i komercjalizuje specjalistyczne związki chemiczne do zastosowań m.in. w rolnictwie i farmacji. Instytut publikuje około 200 oryginalnych prac badawczych rocznie.

KONTAKT:

dr **Agnieszka Kamińska**
Instytut Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie
tel.: +48 22 3433228
email: akaminska@ichf.edu.pl

PUBLIKACJE NAUKOWE:

„Rapid detection and identification of bacterial meningitis pathogens in ex vivo clinical samples by SERS method and principal component analysis”

A. Kamińska, E. Witkowska, A. Kowalska, A. Skoczyńska, P. Ronkiewicz, T. Szymborski, J. Waluk
Analytical Methods, Issue 22, 2016; DOI: 10.1039/c6ay01018k

POWIĄZANE STRONY WWW:

<http://www.ichf.edu.pl/>

Strona Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk.

<http://www.ichf.edu.pl/press/>

Serwis prasowy Instytutu Chemii Fizycznej PAN.

<http://www.ichfdlafirm.pl/>

Oferta Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk skierowana do przedsiębiorców i przemysłu.

MATERIAŁY GRAFICZNE:

ICHf160921b_fot01s.jpg

HR: http://ichf.edu.pl/press/2016/09/ICHf160921b_fot01.jpg

Jedna komórka bakterii wystarcza by ustalić gatunek intruza odpowiedzialnego za chorobę. Szybka i pewna diagnoza zakażeń bakteryjnych stała się możliwa dzięki nowym technikom badania płynu mózgowo-rdzeniowego, opracowanym w Instytucie Chemii Fizycznej PAN w Warszawie. Na zdjęciu: dr Agnieszka Kamińska w laboratorium IChF PAN. (Źródło: IChF PAN, Grzegorz Krzyżewski)