



Warszawa, 25 stycznia 2017

## **Szpitala mogą szybko identyfikować bakterie zagrażające chorym**

*Wkrótce praktycznie każdy szpital będzie w stanie w ciągu zaledwie minut zidentyfikować gatunki bakterii odpowiedzialne za infekcję rozwijającą się u pacjenta. Nową, łatwą do zaadaptowania i tanią procedurę analityczną opracowali naukowcy z Instytutu Chemii Fizycznej PAN w Warszawie. Główną rolę odgrywają w niej nowatorskie biokoniugaty: świecące, magnetyczne mikrocząstki pokryte odpowiednio dobranymi bakteriofagami.*

Gdy do szpitala trafia pacjent z zaawansowaną infekcją bakteryjną, na przykład chory na sepsę, czas nabiera kluczowego znaczenia. Im szybciej uda się ustalić gatunek intruza pustoszącego organizm, tym większa szansa na skuteczną terapię. Tymczasem powszechnie stosowane metody analityczne wciąż wymagają namnażania bakterii (co nierzadko trwa nawet kilka dni) lub specjalistycznego sprzętu, dostępnego w nielicznych laboratoriach. Identyfikację bakterii można jednak przeprowadzić w niemal każdej przyszpitalnej pracowni analitycznej, a czas oczekiwania na wynik skrócić do minut, udowadniają naukowcy z Instytutu Chemii Fizycznej PAN (IChF PAN) w Warszawie na łamach poważanego czasopisma naukowego „Bioconjugate Chemistry”.

Przed przystąpieniem do prac nad nową techniką analityczną badacze z IChF PAN założyli, że powinna ona pozwalać na identyfikację bakterii znacząco szybciej od dotychczasowych metod i być łatwa do wprowadzenia do dużej liczby przyszpitalnych laboratoriów, bez uszczerbku dla dokładności pomiarów. Dodatkowym wymogiem było zapewnienie niskiego kosztu analiz.

„Szybciej, lepiej, taniej – nam udało się zrealizować wszystkie te cele. Może się o tym przekonać każdy zainteresowany, ponieważ z pełną świadomością zrezygnowaliśmy z ochrony patentowej”, mówi dr Jan Paczesny (IChF PAN), który kierował projektem badawczym finansowanym z grantów Narodowego Centrum Nauki.

Urządzeniem detekcyjnym w nowej technice identyfikowania bakterii jest cytometr przepływowy. Mimo pozornie groźnej nazwy jest to dość prosta i względnie tania aparatura, znajdująca się na wyposażeniu wielu szpitali, gdzie stosuje się ją powszechnie w badaniach krwi. Badanie w cytometrze polega na przepuszczaniu próbki przez dyszę, z której wypływa strumień tak wąski, że wszystkie większe drobiny w roztworze, zwłaszcza komórki, muszą w nim płynąć jedna za drugą. Strumień jest oświetlony laserami i otoczony detektorami, które rejestrują światło odbite od poszczególnych drobin, rozproszone na boki oraz przez nie emitowane.

Podstawowym problemem było opracowanie takiego sposobu oznaczania bakterii, aby można je było łatwo wyłapywać z badanej próbki i z dużą pewnością identyfikować za pomocą cytometru. W tym celu naukowcy z IChF PAN postanowili skonstruować specjalne biokoniugaty, czyli kompleksy tworzone przez połączenie nieożywionej mikrocząstki z cząstką biologiczną. Elementem

biologicznym był bakteriofag, czyli wirus infekujący określony gatunek bakterii (w eksperymentach w IChF PAN użyto bakteriofagów T4, atakujących bakterie *Escherichia coli*). Bakteriofagi należało połączyć z mikrocząstkami zdolnymi do emisji światła łatwego do zarejestrowania w cytometrze oraz wykazującymi właściwości magnetyczne. Te ostatnie były niezbędne, ponieważ pozwalały za pomocą zwykłego magnesu odseparować biokoniugaty od pozostałych drobin w badanej próbce.

„Zaczęliśmy od poszukiwań niedrogich, komercyjnie dostępnych mikrocząstek spełniających nasze wymagania. Okazało się, że odpowiednie cząstki są już na rynku – i to dokładnie takie, na jakich nam zależało! Ich powierzchnia jest bowiem pokryta akurat takimi chemicznymi grupami funkcyjnymi, jakie były nam potrzebne do osadzania na nich bakteriofagów praktycznie dowolnego typu”, wyjaśnia doktorantka Marta Janczuk-Richter z grupy prof. Joanny Niedziółki-Jönsson.

Zakupione mikrokulki badacze połączyli z bakteriofagami za pomocą związku z grupy karbodiimidów, znanego jako EDC (jest to substancja stosowana przez wielu chemików właśnie do sklejanie różnych cząstek). Obrazy otrzymane za pomocą mikroskopii konfokalnej potwierdziły, że w nowych biokoniugatach do jednej mikrocząstki zwykle przylegały dwa lub trzy bakteriofagi. W ten sposób otrzymano pierwsze na świecie biokoniugaty o potrójnej funkcji: przyłączające się wyłącznie do jednego gatunku bakterii, reagujące na pole magnetyczne i zdolne do świecenia (fluorescencji).

Procedura identyfikowania bakterii za pomocą tak skonstruowanych biokoniugatów jest prosta. Próbkę – może nią być płyn fizjologiczny pobrany od pacjenta, ale także produkt spożywczy, np. sok marchwiowy – rozcieńcza się, po czym do roztworu dodaje się niewielką ilość wcześniej przygotowanych biokoniugatów. Teraz należy odczekać krótką chwilę, żeby biokoniugaty zdążyły przyłączyć się do bakterii. Do próbki z płynem przykładają się następnie magnes, który przyciąga wszystkie biokoniugaty, w tym te z dołączonymi bakteriami. Po odlaniu pozostałej części próbki i ponownym rozcieńczeniu odseparowanego osadu, roztwór jest przepuszczany przez cytometr.

„Pomiar w cytometrze zwykle trwa około minuty. Wynik to wykres, na którym widzimy, jak oddziałują ze światłem wszystkie biokoniugaty. A ponieważ wiemy, jaki sygnał powinniśmy dostać od czystych biokoniugatów, a więc tych bez bakterii, możemy łatwo ustalić, czy w badanej próbce znajdują się poszukiwane przez nas bakterie, a jeśli tak, to w jakiej liczbie”, mówi doktorant Łukasz Richter z grupy prof. Roberta Hołysta.

Testy w IChF PAN wykazały, że do każdej bakterii przyłącza się zazwyczaj kilka biokoniugatów. Teoretycznie istniałaby więc możliwość wykrycia nawet jednej bakterii. W praktyce pojawiają się jednak pewne ograniczenia, wynikające z właściwości mikrocząstek i cech aparatury pomiarowej. Czyste biokoniugaty mogą się bowiem zlepiać w większe grudki, które w cytometrze generują podobny sygnał co pojedyncze biokoniugaty z dołączoną bakterią.

Biokoniugaty z bakteriofagami jednego typu wykrywają wyłącznie jeden gatunek bakterii. Jednak z uwagi na łatwość przygotowania biokoniugatów, zainteresowane pracownie przyszpitalne mogłyby wcześniej, we własnym zakresie i bez większych problemów, wyprodukować kilkanaście lub kilkadziesiąt rodzajów potencjalnie przydatnych biokoniugatów, każdy z bakteriofagami infekującymi inny gatunek bakterii. W przypadku sepsy, której większość przypadków wywołuje zaledwie kilkanaście gatunków bakterii, przeprowadzenie identyfikacji wymagałoby wówczas równoległego przeprowadzenia co najwyżej kilkunastu testów. Sprawnemu technikowi laboratoryjnemu cała procedura nie powinna zająć więcej niż godzinę.

Institut 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 **Jan Paczesny**  
Instytut Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie  
tel. +48 22 3432071  
email: [jpaczesny@ichf.edu.pl](mailto:jpaczesny@ichf.edu.pl)

mgr inż. **Łukasz Richter**  
Instytut Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie  
tel. +48 22 3433236  
email: [lrichter@ichf.edu.pl](mailto:lrichter@ichf.edu.pl)

mgr inż. **Marta Janczuk-Richter**  
Instytut Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie  
tel. +48 22 3433328  
email: [mjanczuk@ichf.edu.pl](mailto:mjanczuk@ichf.edu.pl)

## **PUBLIKACJE NAUKOWE:**

1. „Bacteriophage-based bioconjugates as a flow cytometry probe for fast bacteria detection”  
M. Janczuk, Ł. Richter, G. Hoser, J. Kawiak, M. Łoś, J. Niedziółka-Jönsson, J. Paczesny, R. Hołyst  
Bioconjugate Chemistry, 2016; DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00596

## **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.

## **MATERIAŁY GRAFICZNE:**

**ICHF170125d\_fot01s.jpg**

HR: [http://ichf.edu.pl/press/2017/01/ICHF170125d\\_fot01.jpg](http://ichf.edu.pl/press/2017/01/ICHF170125d_fot01.jpg)

Za pomocą biokoniugatów można skrócić czas detekcji bakterii w szpitalach do kilkadziesiąt minut. (Źródło: IChF PAN, Grzegorz Krzyżewski)

**ICHF170125d\_fot02s.jpg**

HR: [http://ichf.edu.pl/press/2017/01/ICHF170125d\\_fot02.jpg](http://ichf.edu.pl/press/2017/01/ICHF170125d_fot02.jpg)

Biokoniugat to kompleks utworzony przez połączenie nieożywionej mikrocząstki (tu reprezentowanej przez biało-czerwoną kulkę) z cząstkami biologicznymi (w badaniach w IChF PAN były nimi bakteriofagi T4). (Źródło: IChF PAN)

**ICHF170125d\_fot02s.png (bez tła)**

HR: [http://ichf.edu.pl/press/2017/01/ICHF170125d\\_fot02.png](http://ichf.edu.pl/press/2017/01/ICHF170125d_fot02.png)

Biokoniugat to kompleks utworzony przez połączenie nieożywionej mikrocząstki (tu reprezentowanej przez biało-czerwoną kulkę) z cząstkami biologicznymi (w badaniach w IChF PAN były nimi bakteriofagi T4). (Źródło: IChF PAN)

**ICHF170125d\_fot03s.jpg**

HR: [http://ichf.edu.pl/press/2017/01/ICHF170125d\\_fot03.jpg](http://ichf.edu.pl/press/2017/01/ICHF170125d_fot03.jpg)

Zdjęcia biokoniugatów z mikroskopu konfokalnego. Nieożywiona mikrocząstka magnetyczna w kolorze czerwonym, bakteriofagi T4 w kolorze zielonym. (Źródło: IChF PAN)