

Mikroprzepływy oparte na kroplach zrewolucjonizowały dziedzinę biologii między innymi poprzez wprowadzenie emulsyjnej reakcji łańcuchowej polimerazy (droplet digital PCR) oraz sekwencjonowania genomu pojedynczych komórek. Wysoka przepustowość oraz możliwość powtarzania równoległego generacji kropeł, manipulacji kroplami oraz ich detekcji sprzyja wprowadzaniu ciekawych innowacji w analizie bakterii oraz tworzeniu nowych metod ich diagnostyki. Małe objętości kropli (pikolitry, nanolitry) sprzyjają szybszej detekcji bakterii w porównaniu do standardowych kultur bakteryjnych hodowanych w znacznie większych objętościach (mililitry) ze względu na szybkie zagęszczenie kropli nowymi komórkami, produktami metabolizmu lub wydzielanymi molekułami. Mikroprzepływy kroplowe biorą udział w usprawnieniu technik identyfikacji i precyzyjnego liczenia bakterii, badania wrażliwości na działanie substancji antybakteryjnych (antimicrobial susceptibility testing, AST) oraz analizy fenotypowej i genotypowej heterogeniczności odpowiedzi populacji bakterii na antybiotyki. Metody te pomagają w walce z opornością oraz heteroopornością bakterii oraz pozwalają na zgłębienie mechanizmów ich powstawania. Tradycyjne fenotypowe metody AST (detekcja wzrostu bakterii w obecności antybiotyku), na przykład metoda mikrorozcieńczeń oraz E-test oparte są na wyznaczeniu minimalnego stężenia inhibitującego (MIC) wzrost bakterii. Metody te są wygodne i łatwe w użyciu, ale również wymagające czasowo oraz nie informujące o obecności heteroopornych subpopulacji.

Projekty badawcze, których wyniki opisuje ta rozprawa doktorska skupione były na ulepszeniu lub stworzeniu nowych metod mikroprzepływowych do analizy bakterii, takich jak liczenie, identyfikacja, detekcja wzrostu oraz oznaczanie wrażliwości na substancje antybakteryjne włączając w to analizę populacji bakterii na poziomie pojedynczych komórek w celu oznaczenia ilości heteroopornej subpopulacji.

Rozprawa składa się z czterech rozdziałów. Rozdział 1 przedstawia charakterystykę bakterii, wyjaśnia pojęcia oporności oraz heterooporności bakterii na antybiotyki, opisuje standardowe oraz mikroprzepływowe metody liczenia oraz identyfikacji bakterii, techniki badania wrażliwości na antybiotyki oraz metody detekcji heterooporności. Rozdział 2 przedstawia materiały i metody zastosowane w pracach badawczych, natomiast Rozdział 3 prezentuje otrzymane wyniki w poszczególnych projektach:

I. Precyzyjne liczenie bakterii w szerokim zakresie dynamicznym- opracowaliśmy metodę, której wyjątkową cechą jest bardzo szeroki zakres dynamiczny wyznaczania stężenia bakterii przy wykorzystaniu stosunkowo niewielkiej ilości kropeł w porównaniu do standardowo stosowanych metod kropelkowych opartych jedynie na statystyce Poissona. Wyniki otrzymane z zastosowaniem opracowanej technologii są bardzo porównywalne do wyników otrzymanych z użyciem tradycyjnej metody liczenia kolonii bakteryjnych na płytkach agarowych. Natomiast opracowana technika jest mniej pracochłonna i ma potencjał na znaczne skrócenie czasu analizy.

II. Precyzyjne liczenie oraz identyfikacja bakterii w mieszaninie- jednoczesne liczenie oraz identyfikacja bakterii w mieszaninie bez izolowania poszczególnych szczepów możliwa jest dzięki zastosowaniu ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy. Natomiast metoda ta wymaga czasochłonnej kalibracji oraz wcześniejszego wyizolowania i oczyszczenia materiału genetycznego bakterii w przeciwieństwie do stworzonej przez nas techniki direct droplet digital PCR.

III. Wysokoprzepustowy system do detekcji wzrostu bakterii w nanolitrowych kroplach bez fluorescencyjnego znakowania komórek- tradycyjnie detekcja wzrostu bakterii w kroplach odbywa się poprzez pomiar intensywności fluorescencji, co ogranicza analizę większości klinicznie interesujących szczepów oraz wszechstronne użycie technik kropelowych w mikrobiologii. W związku z tym stworzyliśmy systemy oparte na pomiarze światła rozproszonego oraz autofluorescencji, które umożliwiają detekcję nieznakowanych bakterii Gram-ujemnych oraz Gram-dodatnich z częstotliwością skanowania 1200 kropli/s.

IV. Wysoko rozdzielcza analiza złożonych próbek bakteryjnych- standardowe techniki badania wrażliwości bakterii na antybiotyki nie dostarczają informacji na poziomie pojedynczych komórek oraz niska rozdzielczość testu nie pozwala na ilościowe oznaczenie subpopulacji występującej w małej ilości i wykazującej zmniejszoną wrażliwość na działanie antybiotyku. Stworzyliśmy metodę opartą na wyznaczaniu minimalnego stężenia inhibitującego pojedynczą komórkę (scMIC) służącą do charakteryzowania heterogeniczności populacji bakterii oraz do wyznaczania stężenia heteroopornych subpopulacji. Pomiar wzrostu bakterii w kroplach został przeprowadzony z użyciem detektora światła rozproszonego oraz autofluorescencji.

Rozdział 4 podsumowuje wyniki uzyskane w każdym z projektów badawczych oraz wskazuje ograniczenia i ewentualne modyfikacje w celu zwiększenia funkcjonalności stworzonych metod oraz systemów.