

OPRACOWANIE METODOLOGII BADAŃ ORAZ WYKONANIE WSTĘPNYCH OZNACZEŃ OBECNOŚCI BAKTERII *LEGIONELLA SPP* I *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* W PRÓBKACH ŚRODOWISKOWYCH WODY METODĄ IMMUNOMAGNETOSEPARACJI POŁĄCZONEJ Z CYTOMETRIĄ PRZEPŁYWOWĄ

Zbigniew Dąbrowiecki ¹⁾, Małgorzata Dąbrowiecka ¹⁾, Romuald Olszański ¹⁾, Piotr Siermontowski ^{1,2)}

¹⁾ Zakład Medycyny Morskiej i Hiperbarycznej WIM Gdynia

²⁾ Katedra Technologii Prac Podwodnych AMW Gdynia

STRESZCZENIE

W przypadku wystąpienia epidemii Legionelozy, szybkie i jednoznaczne określenie źródła infekcji, oraz natychmiastowe podjęcie czynności naprawczych jest warunkiem niezbędnym do ograniczenia i zminimalizowania skutków rozwijającej się epidemii. W klasycznej metodzie oznaczania poziomu bakterii z rodzaju *Legionella* w próbkach wody, skuteczność działania reparacyjnego (podwyższenia temperatury wody w instalacji wodociągowej do 60°C, dodatkowe chlorowanie) może być potwierdzone dopiero po 14 dniach!!! Tylko metoda IMMS&FCM skraca czas oznaczenia bakterii *Legionella* do 2-4 godzin, co jest najważniejszym czynnikiem ograniczenia rozwoju epidemii.

Słowa kluczowe: *Legionella spp.*, Legioneloza, immunoseparacja, cytometria przepływowa, systemy dystrybucji ciepłej wody, obiekty użyteczności publicznej, okręty.

ARTICLE INFO

PolHypRes 2019 Vol. 68 Issue 3 pp. 71 – 92

ISSN: 1734-7009 **eISSN:** 2084-0535

DOI: 10.2478/phr-2019-0013

Strony: 22, rysunki: 5, tabele: 5

page www of the periodical: www.phr.net.pl

Typ artykułu: oryginalny

Termin nadesłania: 22.02.2019 r.

Termin zatwierdzenia do druku: 23.07.2019 r.

Publisher

Polish Hyperbaric Medicine and Technology Society



WSTĘP

BAKTERIE *LEGIONELLA* – PODSTAWOWE ZAGROŻENIA MIKROBIOLOGICZNE PRZENOSZONE PRZEZ WODĘ UŻYTKOWĄ W OBIEKTACH I JEDNOSTKACH PŁYWAJĄCYCH MARYNARKI WOJENNEJ RP

Legionella jest powszechnie występującą bakterią, występującą w środowisku wodnym. Szczególnie groźna jest *Legionella pneumophilla*, jeden z ponad trzydziestu gatunków tej bakterii.

Wszystkie bakterie z rodzaju *Legionella* rozwijają się w kałużach brudnej wody, biofilmie zawartym w rurach sieci wodociągowej, u wylotów urządzeń klimatyzacyjnych. Komórki tych bakterii znajdowano również pod sitkami pryszniców i w kranach z bieżącą wodą.

W temperaturze pokojowej *Legionella pneumophilla* może przetrwać w wodzie z kranu ponad 12 miesięcy. Siedliskiem tych bakterii mogą być strumienie, stawy a nawet zwyczajny muł. Zidentyfikowano szczep *Legionella longbeachae* występujący w kompoście i glebie w szklarniach z hodowlą kwiatów.

W 2010 roku ukazało się doniesienie mówiące o nowym źródle infekcji *Legionella spp.* zagrażające szczególnie kierowcom zawodowym. Źródłem tym była zawiesina wody wytwarzana przez system spłukiwania szyb samochodowych [1].

Legionella namnaża się jako wewnątrzkomórkowy pasożyt (w amebach), w biofilmie lub w stanie wolnym w przepływającej wodzie.

W formie aerozolu może dotrzeć do płuc człowieka wywołując ciężką postać zapalenia płuc, Legionelozę lub umiarkowaną infekcję dróg oddechowych zwaną gorączką Pontiac.

Epidemie wywołane przez *Legionella pneumophila* charakteryzują się wysoką śmiertelnością (15-20%), która może dochodzić nawet do 50% w przypadku pacjentów z obniżoną odpornością immunologiczną.

Według portalu internetowego GIDEON on-line na terenie Polski w latach 1999 do 2015 obserwujemy systematyczny wzrost wykrywalności bakterii *Legionella spp.* w środowisku.

Tab.1

Legionella w Polsce.

1999	2003	2004	2005	2006	2007
0	3	8	21	89	29
2008	2009	2010	2011	2012	2013
20	10	36	18	8	11
2014	2015				
12	23				

Generalnie, można powiedzieć, że poziom powyżej którego występuje ryzyko zachorowania dla człowieka wynosi:

10^4 jtk /L lub $6,4 \times 10^4$ jg dla *Legionella spp*

10^2 jtk /L lub $6,4 \times 10^2$ jg dla *Legionella pneumophilla*

Ocena zagrożenia bakterią *Legionella spp.* jest tradycyjnie przeprowadzana metodą zateżnienia próbki wody poprzez wirowanie lub filtrację, a następnie selektywne namnażanie. Traktowana jest jako tzw. „standard odniesienia”, metoda ta ma wiele wad, w tym najważniejszą tzn. długi okres namnażania wynoszący około 10 dni. Tak długi okres, upływający od momentu pobrania próby do momentu otrzymania wyniku, czyni metodę klasyczną bezużyteczną w sytuacji wymagającej szybkiej interwencji i podjęcia działań prewencyjnych.

Dodatkowo w pewnych, nie tak rzadko występujących warunkach takich jak: stres oksydacyjny lub osmotyczny oraz niski poziom składników odżywczych, bakterie z rodzaju *Legionella* mogą stracić zdolności do podziału, zachowując jednocześnie potencjał do powrotu funkcji namnażania się w sprzyjających warunkach.

Te tzw. „uśpione” komórki *Legionella* (VBNC *Legionella* cells) stanowią realne zagrożenie dla człowieka, będąc jednocześnie główną przyczyną rozbieżności występującej w oznaczaniu bakterii *Legionella* metodą klasyczną i RT-PCR.

Obowiązek wykonywania okresowych badań na obecność bakterii z rodzaju *Legionella* w wodzie w budynkach użyteczności publicznej określa Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 29 czerwca 2007 roku w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi (Dz.U.nr 61 poz.417).

W próbkach wody pobranych przez pracowników WSSE Gdańsk oraz w próbkach pobranych przez personel ZMMiH WIM w wybranych obiektach Marynarki Wojennej, przeprowadzono w Laboratorium Badań Środowiskowych ZMMiH WIM oraz Laboratorium Mikrobiologii WSSE testy na obecność bakterii *Legionella spp* metodą klasyczną oraz techniką RT-PCR wykorzystując komercyjne zestawy firmy BioRad oraz firmy Immogena [2,3,4].

Równolegle we wszystkich próbkach wody oznaczano poziom *L. pneumophila* SG1 metodą immunoseparacji IMS z analizą na cytometrze przepływowym (FCM).

Opisane badania miały na celu opracowanie metodyki oznaczenia obecności bakterii *Legionella pneumophila* w próbkach środowiskowych metodami qPCR oraz IMS – immunoseparacji magnetycznej.

LEGIONELLA – METODYKA BADAŃ TECHNIKĄ IMMUNOSEPARACJI I CYTOMETRII PRZEPLYWOWEJ

Metoda separacji przy użyciu cząstek magnetycznych została wynaleziona przez Profesora John'a Ugelstad'a już w latach 70-tych. Obecnie techniki immunoseparacji zrewolucjonizowały metody izolacji wielu biologicznych substancji i cząstek oraz znalazły dużą liczbę zastosowań w licznych dziedzinach nauki, dla których metody oczyszczania i separacji są jednymi z najważniejszych i bardziej złożonych procesów.

Warto podkreślić, że badania nad tą metodą prowadzone są z dużą intensywnością na całym świecie. Z roku na rok zwiększa się liczba zastosowań i pojawiają się liczne opracowania technologiczne, które znacznie przyczyniają się do rozwoju metody np. nieliniowa separacja magnetoforetyczna (ang. *non-linear magnetophoretic separation*), zaletą której jest możliwość zastosowania do jednoczesnego rozdziału wielu patogenów z czułością do miliona razy wyższą niż testy immunologiczne fazy stałej, dziś powszechnie stosowane w diagnostyce.

Wiele zalet metody immunoseparacji przyczyniło się do znacznego rozwoju metody, poprawy jej wydajności i opracowania cząstek magnetycznych z immobilizowanymi przeciwciałami o niższym stopniu sedymentacji, mniejszych rozmiarach i bardzo zróżnicowanym składzie kompozytowym. Atrakcyjne pod względem finansowym i bardzo wydajne sposoby są niezwykle istotnymi czynnikami w przemysłowej biotechnologii oraz biologicznych rutynowych procedurach diagnostycznych. Biomagnetyczne techniki izolacji stały się niezwykle ważne i znalazły zastosowanie w wielu dziedzinach, takich jak inżynieria genetyczna, immunologia oraz diagnostyka molekularna.

Cząstki magnetyczne z rdzeniem zbudowanym z magnetytu i opłaszczone swoistymi przeciwciałami są drobinami o bardzo dużej stabilności, jednolitości, unikalnych paramagnetycznych właściwościach, niskiej interakcji między sobą oraz dużej zdolności do dyspersji. Stanowią bardzo dobrą alternatywę w stosunku do obecnie szeroko stosowanej technologii oczyszczania kwasów nukleinowych na kolumnach z różnymi typami sorbentów. Ich zastosowanie pozwala na znaczne skrócenie czasu oraz zredukowanie nakładów inwestycyjnych związanych z kosztowną realizacją procesu technologicznego jakim jest separacja komórek bądź wydajna ekstrakcja kwasów nukleinowych.

Szybka separacja komórek, bądź oczyszczanie kwasów nukleinowych jest kluczowym etapem większości procedur stosowanych w biologii molekularnej i diagnostyce. Głównym celem tego etapu jest uzyskanie wysokiej jakości i czystości materiału biologicznego, niezależnie od źródła jego pochodzenia. Procesy separacji stanowią pierwszy z etapów poprzedzający zastosowanie jakiegokolwiek innej techniki molekularnej. W obecnym czasie zastosowanie nowoczesnych technik molekularnych stanowi potężny oręż pozwalający analizować architekturę genów i kontrole ich ekspresji. Pozyskany materiał wykorzystuje się w innych technikach molekularnych takich jak łańcuchowa reakcja polimeryzacji PCR, RTPCR, qPCR, konstrukcja bibliotek genomowych, hybrydyzacja, RFLP, ALFP oraz do przygotowywania mikro-macierzy do analizy ekspresji genów.

Do popularyzacji metod immunoseparacji i ich implementacji rynkowej przyczynia się przede wszystkim rosnące zapotrzebowanie ze strony medycyny i biotechnologii przemysłowej. Badania molekularne wykorzystuje się w analizie markerów nowotworowych, diagnostyce chorób bakteryjnych np. borelioza i wirusowych np. wirusowe zapalenie wątroby HCV, HBV lub analizie źródeł potencjalnego skażenia np. analizie próbek wody [5].

Materiałem poddanym badaniom są zazwyczaj próbki krwi obwodowej, tkanek zwierzęcych i roślinnych, krwi zasuszonej, spermy, płam śliny i krwi pobranej od różnych gatunków zwierząt, fragment grzybni, próbki wody. W chwili obecnej trudno wyobrazić sobie np. dochodzenie spornego ojcostwa lub medycyny sądowej i kryminalistyki bez zastosowania technik molekularnych do badania mikrośladów i śladów biologicznych znalezionych na miejscu przestępstwa, które mogą stanowić materiał dowodowy. Istnieje wiele metod ekstrakcji materiału z próby badanej jednak dobór najważniejszej z nich jest uzależniony od rodzaju analizowanego materiału.

Dobór metody przygotowania próbek przed analizą technikami molekularnymi ma decydujące znaczenie dla uzyskania odpowiedniej czułości techniki analitycznej i jest w większości przypadków kluczowy dla powodzenia całego procesu diagnostycznego.

Dokonując wyboru odpowiedniej metody należy uwzględnić szerokie spektrum zastosowania otrzymanych izolatów w dalszych procesach analitycznych. Różne wymagania jakościowe powodują, że trudno jest zaproponować jedną wspólną technikę przygotowania próby dla technik opierających się o oznaczenia genomowe takie jak klasyczny PCR, qPCR, LAMP Loop (Mediated Isothermal Amplification), CPA (Cross Primer Amplification) i proteomiczne – ELISA, immunochromatografia (LF).

Dotychczasowe, stosowane techniki analityczne, oprócz metody klasycznej (posiew), w większości bazują na ekstrakcji kwasów nukleinowych, bądź analizie proteomicznej i zazwyczaj stanowią kombinacje dwóch lub większej ilości poniżej wymienionych technik: wytrącania poprzez ekstrakcję rozpuszczalnikową, chromatografii, wirowania, rozdziału opartego na powinowactwie. Popularne metody oznaczania genomowego DNA bakterii (PCR, qPCR) zostały opracowane w oparciu o ekstrakcję kwasów nukleinowych metodą chromatografii kolumnowej. Specjalnie przygotowane kolumny z sorbentem lub membraną, wiążą kwasy nukleinowe w warunkach wysokiej siły jonowej. Zastosowanie techniki chromatograficznej pozwoliło na znaczne uproszczenie i skrócenie czasu izolacji kwasów nukleinowych w stosunku do metod klasycznych, a w szczególności metody ekstrakcji rozpuszczalnikowej.

Ograniczenia metody wynikają ze stałej ilości sorbentu w kolumnie chromatograficznej, która pozostaje niezmienna, natomiast zwiększenie wydajności procesu izolacji wiąże się z wykorzystaniem dużo większej liczby kolumny, bądź zakupem wersji zestawu przeznaczonego do innej skali z większą ilością sorbentu, co stanowi dodatkową barierę ekonomiczną, bądź wydłuża czas przygotowania materiału do analizy. Innym ograniczeniem metody chromatograficznej jest dość wysoki stopień fragmentacji DNA, który może mieć wpływ na sam proces analityczny. Na kolumnach z sorbentem uzyskuje się zazwyczaj fragmenty o długości od kilkudziesięciu do maksymalnie kilkuset tysięcy par zasad, co w znaczny sposób utrudnia przeprowadzenie dokładnego pomiaru ilościowego kwasów nukleinowych. Dodatkowym ograniczeniem techniki polegającej na ekstrakcji genomowego DNA jest niemożność odpowiedzi na pytanie czy z izolatu wyekstrahowano żywe, czy martwe komórki. Dlatego stosując te metody, nie można jednoznacznie odpowiedzieć na pytanie czy materiał poddany ocenie ma charakter infekcyjny. Ponadto techniki chromatograficzne dodatkowo wymagają użycia specjalistycznych urządzeń, co

również mocno limituje łatwość przeprowadzenia procesu przygotowania próby.

Praktycznie nie ma możliwości zastosowania metod chromatograficznych do badania większej liczby prób niż kilkadziesiąt jednocześnie.

Opracowując metodykę badania na etapie przygotowania próby starano się uwzględnić wszystkie kryteria oceny metody i w końcowym etapie doprowadzić do opracowania szybkiej, i wiarygodnej metody diagnostycznej, która dodatkowo umożliwiłaby pełną automatyzację tego procesu.

Analizując techniki separacji poddaliśmy ocenie wiele parametrów mających wpływ na wydajność, czułość, specyficzność procesu diagnostycznego oraz skalowalność metody, ryzyko kontaminacji i możliwość jej automatyzacji.

Wysoka wydajność procesu separacji/izolacji, czyli ilość pozyskanych komórek bakterii, bądź cząstek kwasu nukleinowego lub antygeny białkowego w przeliczeniu na określoną ilość materiału wyjściowego, który pobrano do przeprowadzenia analizy, gwarantuje osiągnięcie optymalnej czułości metody analitycznej.

Czułość metody jest również parametrem określającym minimalną ilość materiału, który użyty do izolacji pozwoli na uzyskanie jej mierzalnego wyniku, bądź pozytywnego efektu w następstwie zastosowania metody analitycznej. Jest to szczególnie ważne w przypadku badań diagnostycznych, gdzie czułość zastosowanej metody diagnostycznej może zadecydować o życiu badanego pacjenta. W trakcie badania walidacyjnego określa się parametr LOD – limit detekcji metody analitycznej.

Czystość uzyskanego izolatu kwasu nukleinowego lub białka w znacznej mierze determinuje dobór pozostałych technik badawczych i w decydujący sposób wpływa na czułość oraz wydajność przyjętej metody badawczej. Uzyskanie wysokiej czystości kwasów nukleinowych i białek często decyduje o powodzeniu i wyniku całego badania diagnostycznego.

Skalowalność metody decyduje o możliwości zwiększenia lub zmniejszenia skali procesu względem aktualnej potrzeby. Możliwość pozyskania większej lub mniejszej ilości izolatu z próby o szerokim zakresie objętości, czyni go bardziej uniwersalnym i opłacalnym.

Ryzyko kontaminacji stanowi ryzyko biologicznego zanieczyszczenia próby w trakcie procesu. Zwiększone ryzyko zanieczyszczenia próby w trakcie realizacji procesu eliminuje przydatność metody w diagnostyce molekularnej.

TECHNIKA IMMUNOSEPARACJI

Biorąc pod uwagę powyższe kryteria jedyną metodą do zastosowania w analizie próbek wody pod kątem występowania bakterii *Legionella pneumophila* jest technika IMS – immunoseparacji działająca w oparciu o cząstki magnetyczne opłaszczone frakcją immunoglobulin swoiście wiążących antygeny powierzchniowe bakterii *Legionella pneumophila*. Cząstki magnetyczne zastosowane w trakcie opracowywania metody badania *L. pneumophila* otrzymano z firmy Rqmicro (Szwajcaria).

Wyodrębniono kilkanaście pochodnych aminosilanów, które mogą zostać z powodzeniem deponowane na powierzchni magnetytu i zastosowane do przygotowania sorbentów w technice IMS stanowiących bazę do przyłączenia frakcji immunoglobulin specyficznie wiążących antygeny bakterii np. *Legionella pneumophila*.

Średnica cząstek magnetycznych z immobilizowaną frakcją białek z grupy immunoglobulin IgG anty – *Legionella pneumophila* jest skalibrowana jest na ~100 nm, więc uzyskane na ich bazie złoża magnetyczne charakteryzuje się bardzo dobrze rozwiniętą powierzchnią wiązania, przy jednoczesnym zachowaniu bardzo silnych właściwości magnetycznych.

Uzyskane cząstki magnetyczne zostały gruntownie przebadane pod względem stabilności a otrzymane dane potwierdzają ich wysoką przydatność do realizowania założonego celu. Technika immunoseparacji IMS umożliwia bardzo szybkie, specyficznie wydajne i wiązanie całych komórek bakteryjnych bakterii *Legionella pneumophila* do powierzchni cząstek.

Wyprodukowany na bazie w/w cząstek magnetycznych zestaw firmy Rqmicro – *L. pneumophila* SG1 poddano ocenie w ramach bieżącego opracowania.

CYTOTOMETRIA PRZEPLYWOWA (FCM) [6]

Cytometria przepływowa, pierwsza technika stworzona do analizy pojedynczych komórek, łączy w sobie elastyczność i czułość technologii fluorescencyjnej z szybkością i możliwościami integracji danych. Stała się złotym standardem w analizie komórkowej i jest obecnie stosowana jako narzędzie analityczne w wielu sektorach nauk biologicznych.

W miarę rozwoju badań w dziedzinie biologii komórkowej cytometria przepływowa ze względu na powszechność użycia znajduje coraz większą ilość zastosowań analitycznych. Oferuje ona badaczom i klinicytom kilka istotnych możliwości.

Po pierwsze, umożliwia analizę populacji komórek na zasadzie cell-by-cell (jedna komórka po drugiej). Jest to zdolność o decydującym znaczeniu z punktu widzenia dzisiejszych badaczy i klinicystów, którzy szukają bardzo specyficznych komórek wśród wielu występujących w badanej próbce. Umożliwia to diagnozowanie bądź monitorowanie wielu procesów biologicznych będących podstawą groźnych chorób lub monitorowanie pojawiających się zagrożeń biologicznych w próbach badanych.

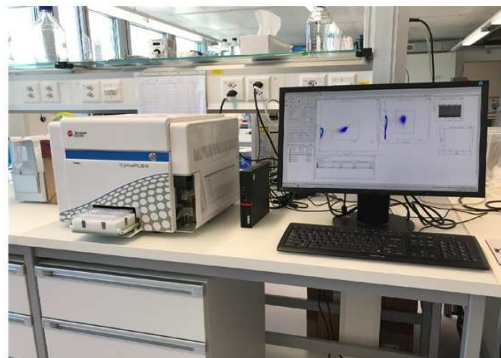
Po drugie, cytometria przepływowa posiada zasadniczą zaletę – jest nadzwyczaj szybka. Tempo rutynowej analizy próbek może sięgać 10 000 komórek na sekundę – jest to niewiarygodny postęp względem historycznych metod wzrokowego badania i zliczania komórek. Technika ta umożliwia jednoczesny pomiar wielu parametrów (tzw. multipleksing) pojedynczych komórek.

Przy zastosowaniu techniki cytometrii przepływowej można zarówno sortować, jak i analizować populacje komórek. Jest to cenne, ponieważ analizie można poddać konkretny rodzaj komórek, które szukamy. Gdy tylko zidentyfikowana zostaje populacja komórek, które mają być poddane sortowaniu, strumień cieczy zawierający próbkę jest przekierowywany przy wysokim ciśnieniu przez układ płynów w jeden strumień w taki sposób, że komórki przechodzą pojedynczo przez wiązkę laserową, gdzie wykrywane są informacje o komórkach. Jeśli komórka odpowiada określonym parametrom, cytometr generuje ładunek elektryczny. W efekcie naładowana komórka jest odchylana do próbki i sortowana. Posortowane komórki można

poddać hodowli lub zbadać przy użyciu innych testów. Nienaładowane kropelki kierowane są wraz ze strumieniem do pojemnika na odpady. Proces ten przebiega szybko i można w ten sposób przeanalizować około 20 000 komórek na sekundę.

Cytometry przepływowe zawierają trzy główne układy – płynowy, optyczny i elektroniczny. Układ płynowy przepuszcza próbkę całych komórek (np. próbkę po IMS) przez komorę przepływową w taki sposób, że komórki przechodzą pojedynczo przez wiązkę laserową. Każda komórka przechodzi przez wiązkę, rozprasza światło i może emitować światło fluorescencyjne. Te sygnały świetlne są zbierane przez układ optyczny i kierowane do rozmaitych detektorów. Sygnały otrzymywane przez detektory są następnie przekształcane w wartości numeryczne przez układ elektroniczny. Wyniki mogą być wyświetlane na ekranie lub zapisane dla celów przyszłej analizy przy użyciu specjalnie zaprojektowanego oprogramowania. Gdy każda komórka przechodzi przez wiązkę, jej parametry (cechy np. czy jest żywa lub martwa) są mierzone i zapisywane wraz z czasem przejścia przez wiązkę. Zwykle dane zbierane są co najmniej dla 10 000 komórek na próbkę.

Do znakowania komórek w cytometrii używa się najczęściej przeciwciał monoklonalnych, które pozwalają badaczom „znakować” – określone populacje komórek. Jednoczesna analiza wielu populacji komórek oraz parametrów ich funkcjonowania, wymagała włączenia do technologii analizy fluorescencji i wielokolorowego barwienia. Efektem tego mariażu technologii jest powstanie bardzo efektywnego systemu, który między innymi może służyć do monitorowania zagrożeń biologicznych. Jego zdecydowaną zaletą jest możliwość analizy pojedynczych komórek oraz ich późniejszego pogrupowania np. na żywe i martwe.

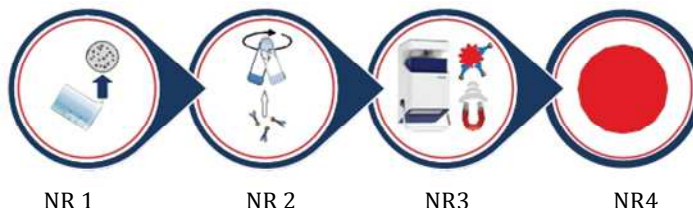


Rys. 1 Cytometr przepływowy Cytoflex z multisamplerem Laser: 488nm (525/40 BP; 690/50 BP). Producent Beckman Coulter, SN:AW27181.

METODYKA BADAŃ

Metodyka badania *L. pneumophila* (IMS) składa się z czterech etapów:

1. Zagęszczanie próby wody poprzez filtrację i rozpuszczenie w niewielkiej ilości buforu (NR1).
2. Inkubacja - wiązanie komórek bakterii Legionella z cząstkami magnetycznymi (NR2).
3. Oczyszczanie przy użyciu immunoseparatora magnetycznego CellStream (NR3).
4. Analiza ilościowej próby na cytometrze przepływowym i urządzeniu do prowadzenia reakcji qPCR (NR4).



NR 1

NR 2

NR 3

NR 4

Rys. 2 Graficzna prezentacja poszczególnych etapów analizy próbki wody pod kątem obecności Legionella pneumophila metodą IMS&FCM.

Tab. 2

Zestaw *L. pneumophila* SG1 składa się z następujących komponentów.

Cząstki magnetyczne	przeciwciała frakcji IgG anti- <i>L. pneumophila</i>
Wskaźnik integralności membrany	Jodek propidyny
Kontrola pozytywna - liofilizat komórek Legionella pneumophila SG1-cells (Philadelphia)	Liofilizowana
Filtry	Poliwęglan średnica porów 0.22 µm; R - 47 mm
Bufor 1	Bufor do inkubacji
Bufor 2	Bufor do separacji
Kartridż	16tw
Tubes	5 mL
Filtry do prefiltracji próbek wody	Poliwęglan średnica porów 5 µm



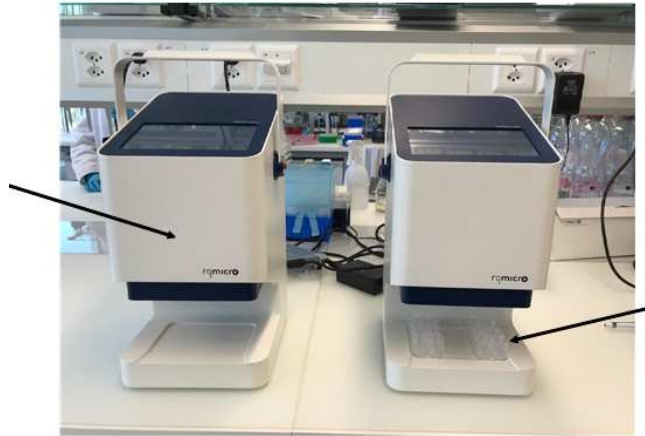
Dane walidacyjne *L. pneumophila* SG1 (Rqmicro) potwierdzające brak reakcji krzyżowych ze szczepami o wysokiej homologii filogenetycznej oraz innymi gatunkami bakterii często występujących w próbkach wody.

<i>Legionella anisa</i>	<i>Legionella jamestowniensis</i>	<i>Legionella oakridgiensis</i>
<i>Legionella birminghamensis</i>	<i>Legionella jordanis</i>	<i>Legionella parisiensis</i>
<i>Legionella bozemanii</i>	<i>Legionella londoniensis</i>	<i>Legionella rubilucens</i>
<i>Legionella cincinnatiensis</i>	<i>Legionella longbeachae</i>	<i>Legionella taurinensis</i>
<i>Legionella dumoffii</i>	<i>Legionella micdadei</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Citrobacteri gillenii</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria welshimeri</i>
<i>Listeria fleishmanii</i>		

Dane walidacyjne *L. pneumophila* SG1 (Rqmicro) potwierdzający wysoką specyficzność oznaczenia względem szczepów *Legionella pneumophila*.

Szczep	Nr ref.	Wynik analizy
<i>Legionella pneumophila Philadelphia</i>	DSM7513	+
<i>Legionella pneumophila Allentown</i>	ATCC43106	+
<i>Legionella pneumophila Bellingham</i>	DSM25214	+
<i>Legionella pneumophila Benidorm</i>	DSM25199	+
<i>Legionella pneumophila Benidorm</i>	DSM27564	+
<i>Legionella pneumophila Cambridge-1</i>	NCTC11231	+
<i>Legionella pneumophila Camperdown</i>	ATCC43113	+
<i>Legionella pneumophila France</i>	ATCC43112	+
<i>Legionella pneumophila Heysham</i>	ATCC43107	+
<i>Legionella pneumophila Knoxville</i>	DSM25070	+
<i>Legionella pneumophila OLDA</i>	DSM25200	+
<i>Legionella pneumophila Oxford</i>	DSM25213	+
<i>Legionella pneumophila Philadelphia-2</i>	NCTC11193	+
<i>Legionella pneumophila Pontiac</i>	NCTC11191	+
<i>Legionella pneumophila Washington</i>	NCTC11201	+

Proces immunoseparacji IMS przeprowadzono przy użyciu *L. pneumophila* SG1 przy zastosowaniu aparatu CellStream (Rqmicro). Wybór pomiędzy metodą manualną a automatyczną podyktowany był ograniczeniem przypadkowej kontaminacji badanych prób w przypadku metody manualnej. Ponadto używając aparatu typu CellStream uzyskano wysoką powtarzalność przeprowadzonych badań, która znacząco wpływa na wiarygodność metody. Dodatkowym atutem jest bardzo krótki czas procesu < 2 godz. który nie wymaga zaangażowania uwagi użytkownika.



Rys. 3 Urządzenia typu CellStream wykorzystane do badania próbek wody. Strzałka z lewej wskazuje na immunoseparator magnetyczny. Strzałka z prawej to kartridż do aparatu CellStream.

MATERIAŁY NIEZBĘDNE DO REALIZACJI METODYKI BADANIA *L. PNEUMOPHILA*

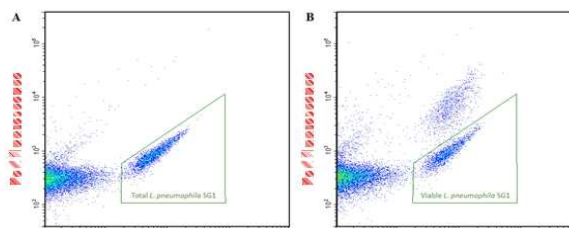
- Legionella kit (rqmicro) SG1 *L. pneumophila*
- CellStream instrument (automatyczne urządzenie do techniki immunoseparacji IMS)
- Cytometr przepływowy (488nm laser - 2 kanały detekcji Dy490 and PI, np. Cytoflex Beckman
- Coulter, 525/40BP I 690/50 BP)
- Worteks
- Mieszadło typu karuzela
- Pipety o objętości (1000ul/200 ul/20 ul)
- Probówki typu Eppendorf o objętości 1,5 ml
- Statyw do probówek typu Eppendorf
- Probówki typu 50 ml falcon
- Statyw na probówki 50 ml typu falcon
- Probówki 15 ml typu falcon
- Statyw na probówki 15 ml typu falcon
- Pęseta
- Rękawiczki
- Chustki jednorazowe
- 70% roztwór etanolu w wodzie
- Nożyczki
- Taśma klejąca
- Cienkopis (niezmywalny)
- Fartuch ochronny
- Torebki na odpady biologiczne
- Timer
- Folia aluminiowa

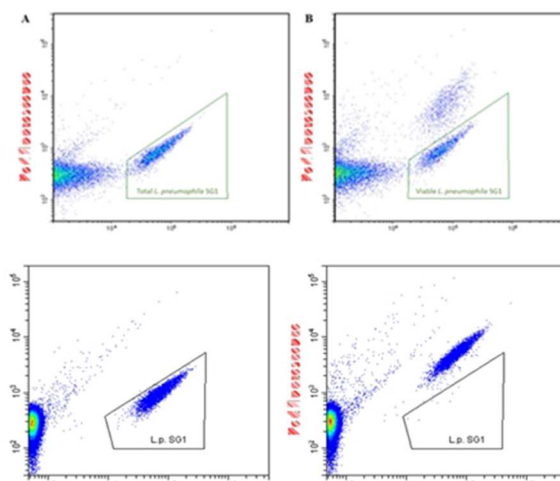
Przeprowadzono następujące analizy:

- Detekcję kontroli pozytywnej w procesie *L. pneumophila* SG1 metodą immunoseparacji IMS z analizą na cytometrze przepływowym (FCM).

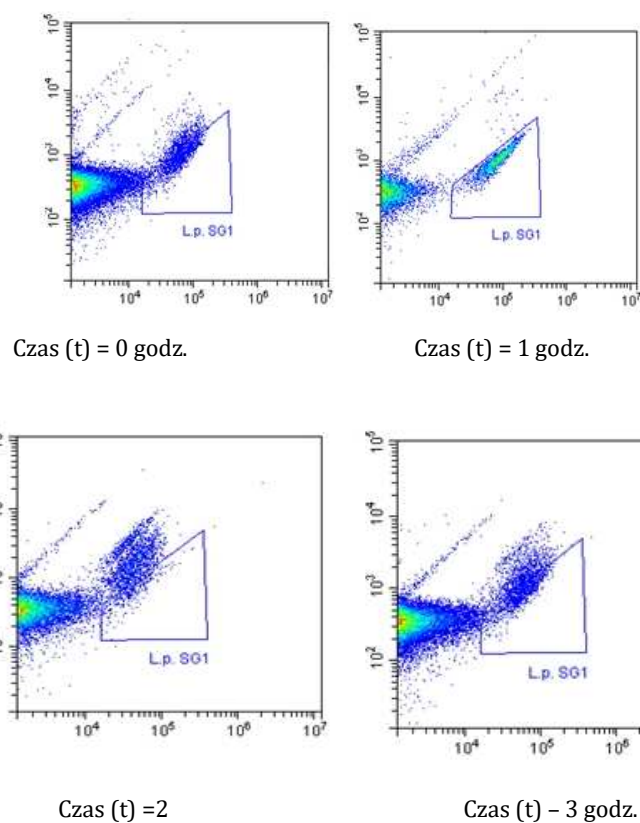
Chemicznie inaktywowany szczep *L.p.SG1* (A). komórki żywe obecne będą wyłącznie się w oknie *L.p. SG1* po zastosowaniu barwnika dyskryminującego (B). Oś (x) - fluorescencja w zakresie koloru zielonego, oś (y) – fluorescencja w zakresie koloru czerwonego. 5.5×10^4 total *L. pneumophila*.

- Detekcję *L. pneumophila* z próby wody w procesie SG1 metodą immunoseparacji IMS z analizą na cytometrze przepływowym (FCM).





Rys. 4 Próbkę wody wodociągowej L.p. SG1 (A). Frakcja martwych komórek która została przeniesiona poza okno po wyznakowaniu preparatu barwnikiem dyskryminującym (B). Komórki żywe można zaobserwować wyłącznie w oknie. Oś (x) - fluorescencja w zakresie koloru zielonego, oś (y) – fluorescencja w zakresie koloru czerwonego. 4×10^4 total L. pneumophila in A. 2.8×10^4 żywe komórki L. pneumophila in B.



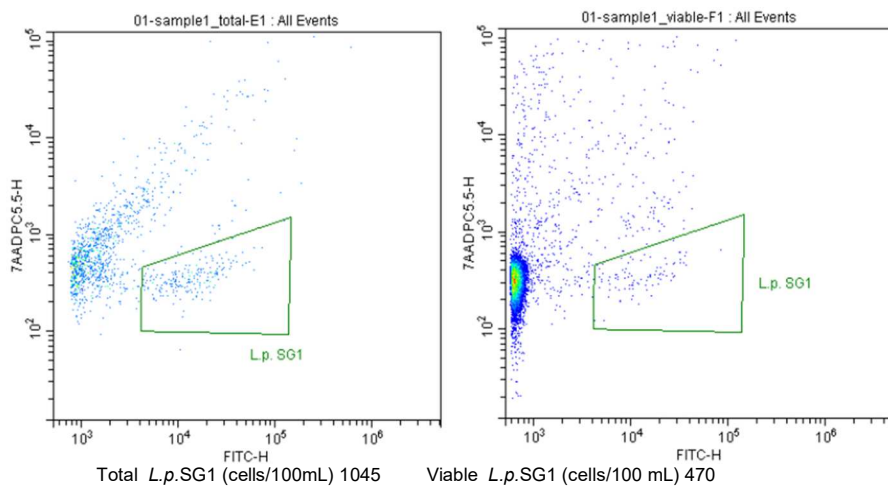
Rys. 5 Detekcja L. pneumophila procesie SG1 metodą immunoseparacji IMS z analizą na cytometrze przepływowym (FCM) po zastosowaniu inaktywacji temperaturowej 70°C . Po 3 godzinach zaobserwowano 85% inaktywację wykrytego szczepu L. pneumophila. Oś (x) - fluorescencja w zakresie koloru zielonego, oś (y) – fluorescencja w zakresie koloru czerwonego.

WYNIKI ANALIZ

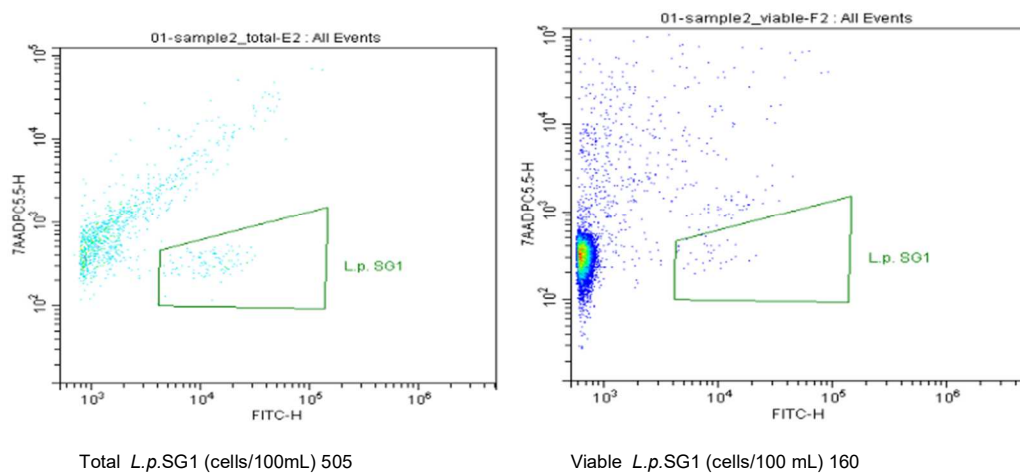
Do badań wykorzystano próbki wody pobrane we wrześniu 2018 roku z wybranych jednostek Marynarki Wojennej zlokalizowanych w Porcie Wojennym Gdynia. Objętość każdej z próbek 200ml.

Wyniki uzyskane z cytometrii przepływowej po użyciu techniki immunoseparacji dla prób wody od 1-19.

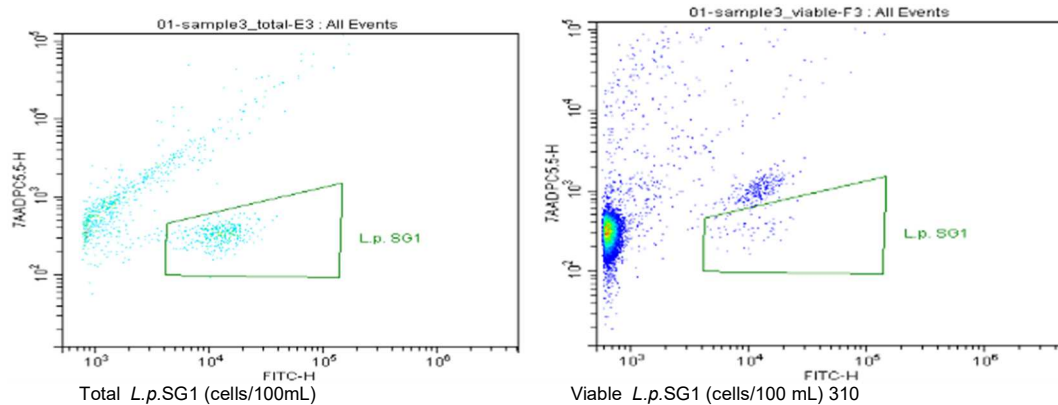
Próbka nr 1



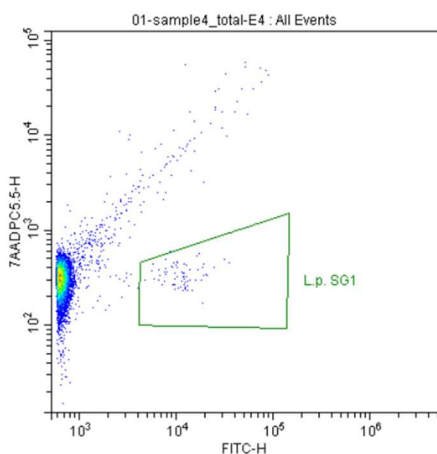
Próbka nr 2



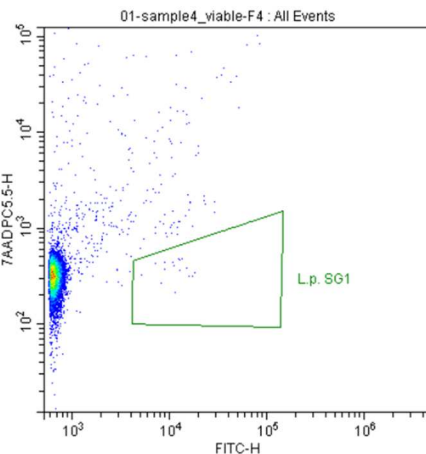
Próbka nr 3



Próbka nr 4

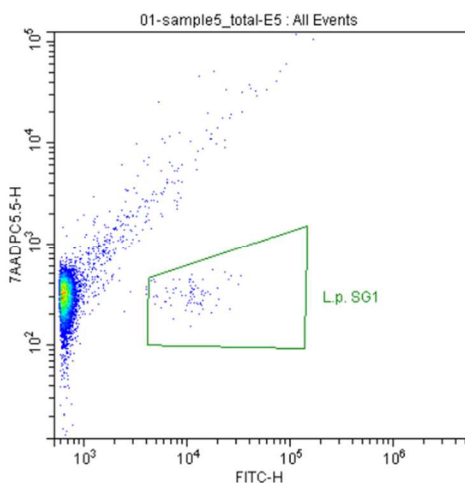


Total *L.p.SG1* (cells/100mL) 335

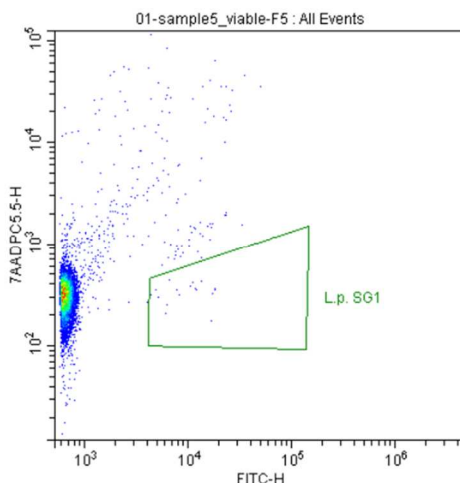


Viable *L.p.SG1* (cells/100 mL) 85

Próbka nr 5

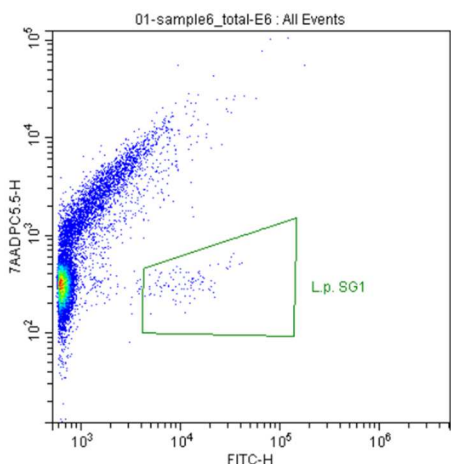


Total *L.p.SG1* (cells/100mL) 385

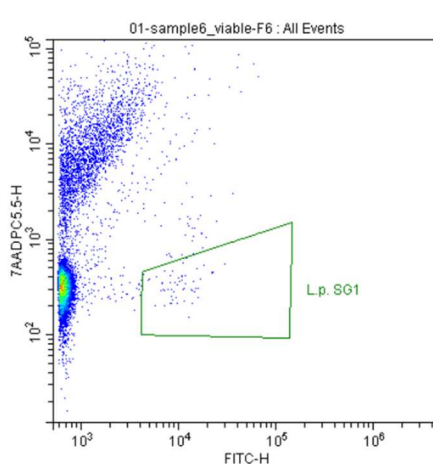


Viable *L.p.SG1* (cells/100 mL) 90

Próbka nr 6

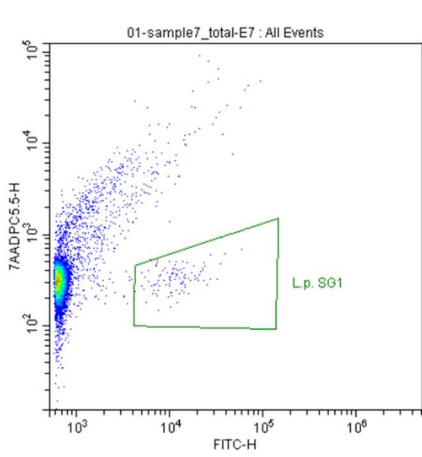


Total *L.p.SG1* (cells/100mL) 480

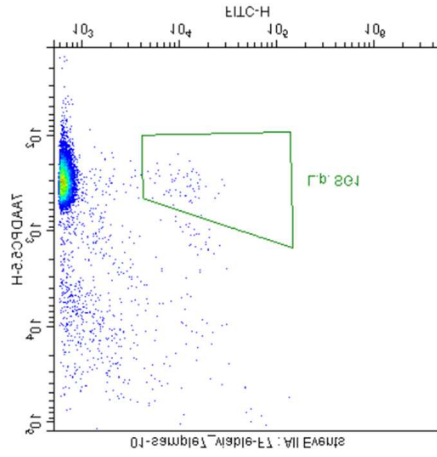


Viable *L.p.SG1* (cells/100 mL) 275

Próbka nr 7

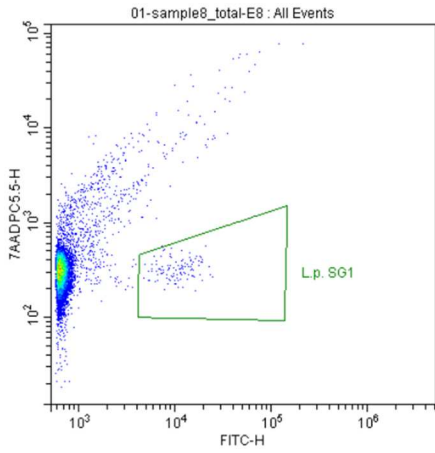


Total *L.p.SG1* (cells/100mL) 520

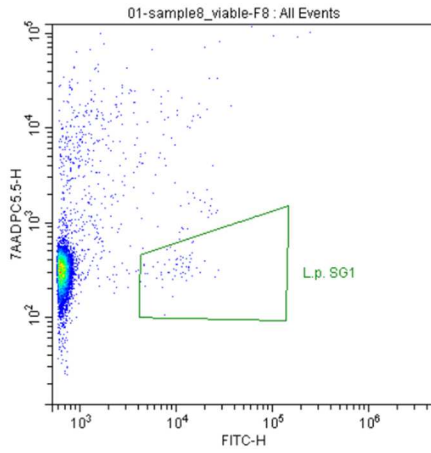


Viable *L.p.SG1* (cells/100 mL) 290

Próbka nr 8

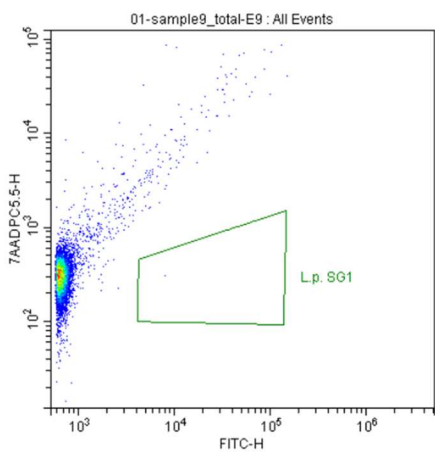


Total *L.p.SG1* (cells/100mL) 545

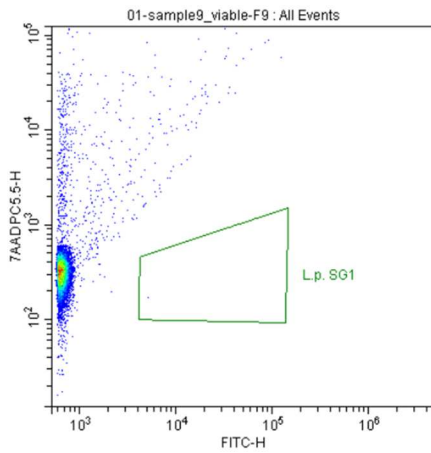


Viable *L.p.SG1* (cells/100 mL) 295

Próbka nr 9

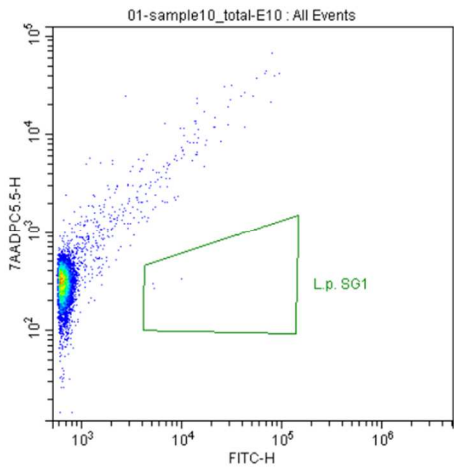


Total *L.p.SG1* (cells/100mL) 0

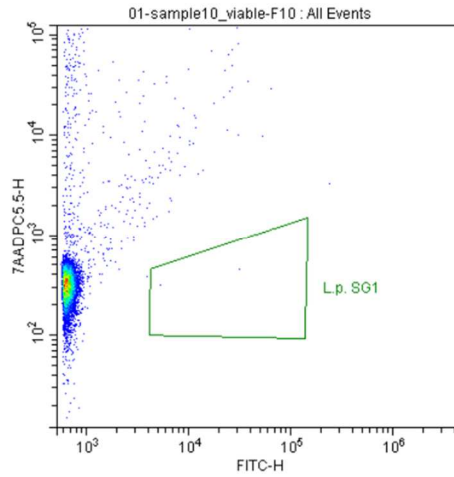


Viable *L.p.SG1* (cells/100 mL) 0

Próbka nr 10

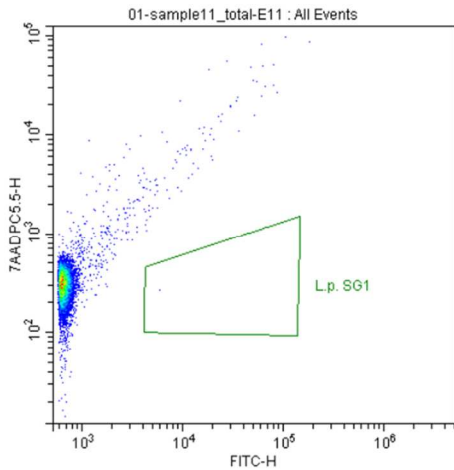


Total *L.p.SG1* (cells/100mL) 0

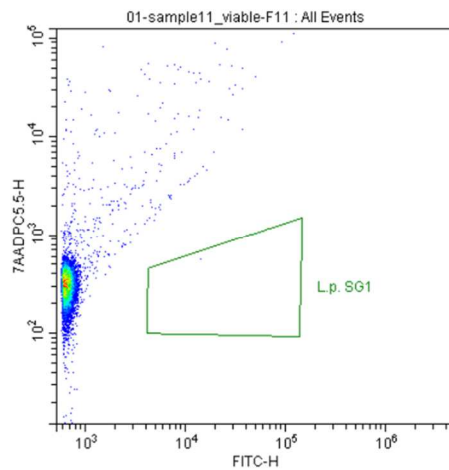


Viable *L.p.SG1* (cells/100 mL) 0

Próbka nr 11

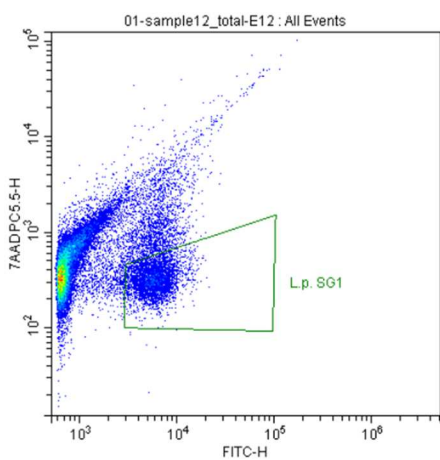


Total *L.p.SG1* (cells/100mL) 0

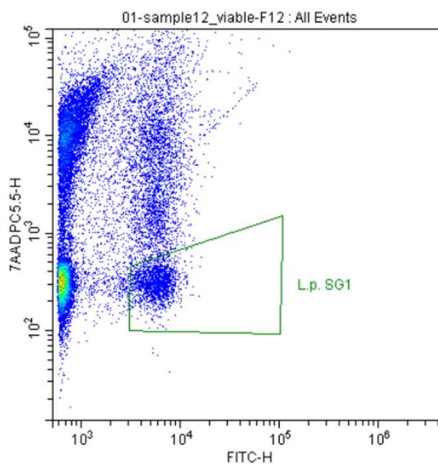


Viable *L.p.SG1* (cells/100 mL) 0

Próbka nr 12

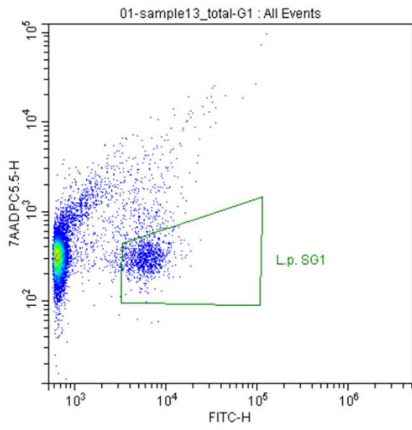


Total *L.p.SG1* (cells/100mL) 20 565 20'565

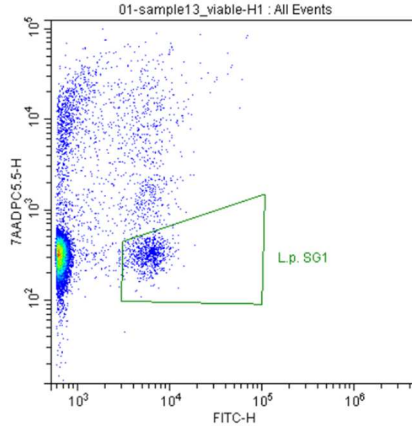


Viable *L.p.SG1* (cells/100 mL) 9 645 9'64565

Próbka nr 13

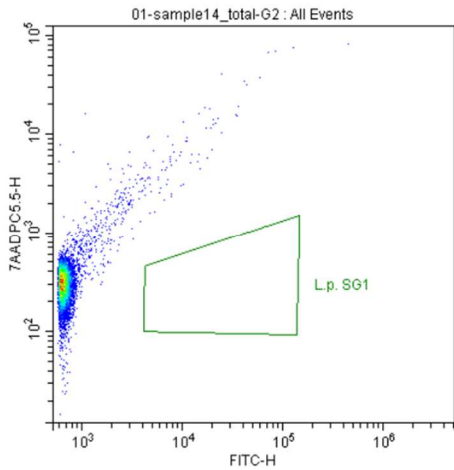


Total *L.p.SG1* (cells/100mL) 4 995 4'99520'565

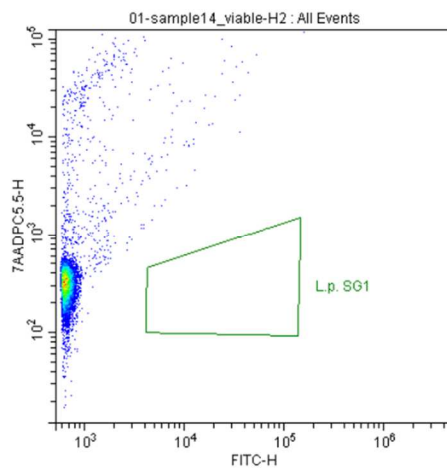


Viable *L.p.SG1* (cells/100 mL) 3 600 3'6009'64565

Próbka nr 14

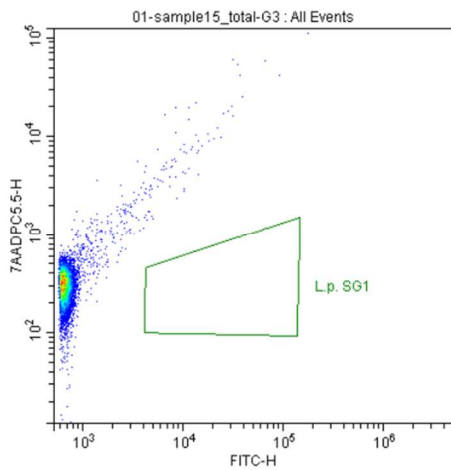


Total *L.p.SG1* (cells/100mL) 0 4'99520'565

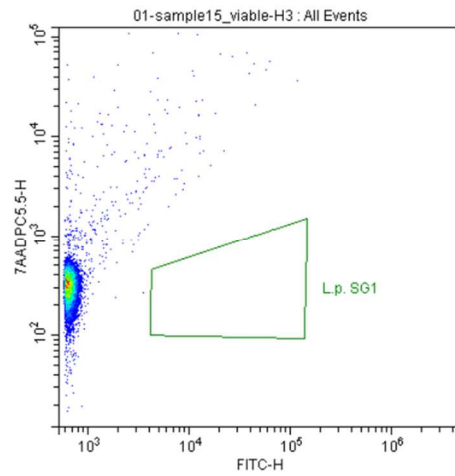


Viable *L.p.SG1* (cells/100 mL) 0 3'6009'64565

Próbka nr 15

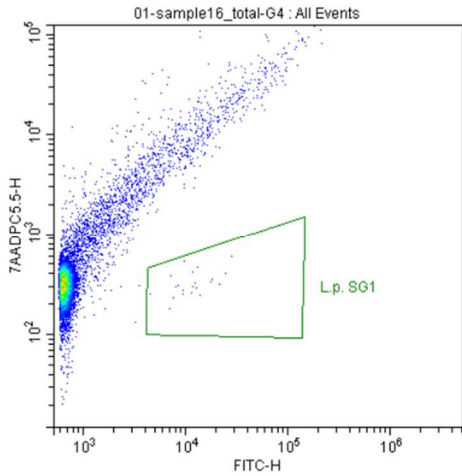


Total *L.p.SG1* (cells/100mL) 0 4'99520'565

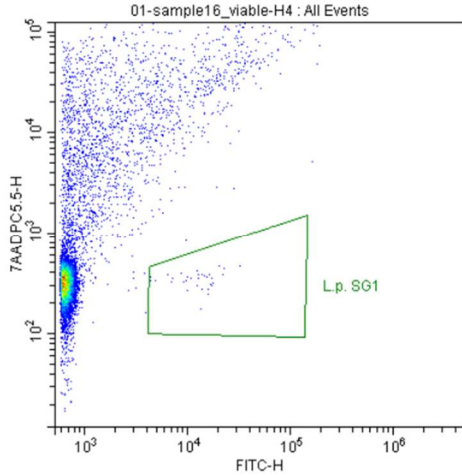


Viable *L.p.SG1* (cells/100 mL) 0 3'6009'64565

Próbka nr 16

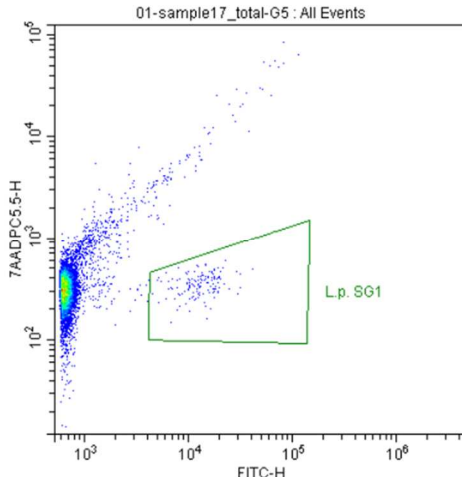


Total *L.p.SG1* (cells/100mL) 165 4'99520'565

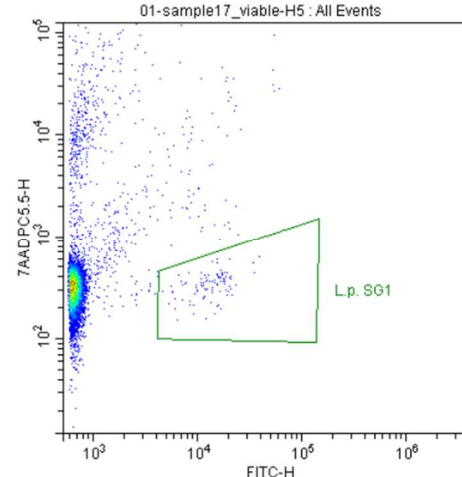


Viable *L.p.SG1* (cells/100 mL) 110

Próbka nr 17

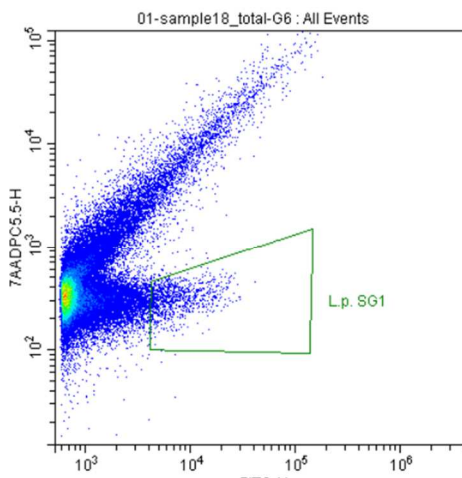


Total *L.p.SG1* (cells/100mL) 680 4'99520'565

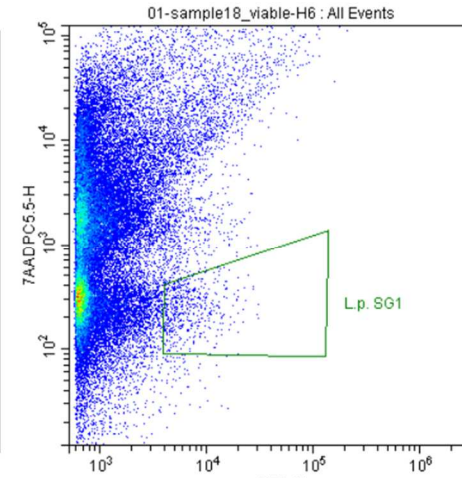


Viable *L.p.SG1* (cells/100 mL) 490

Próbka nr 18

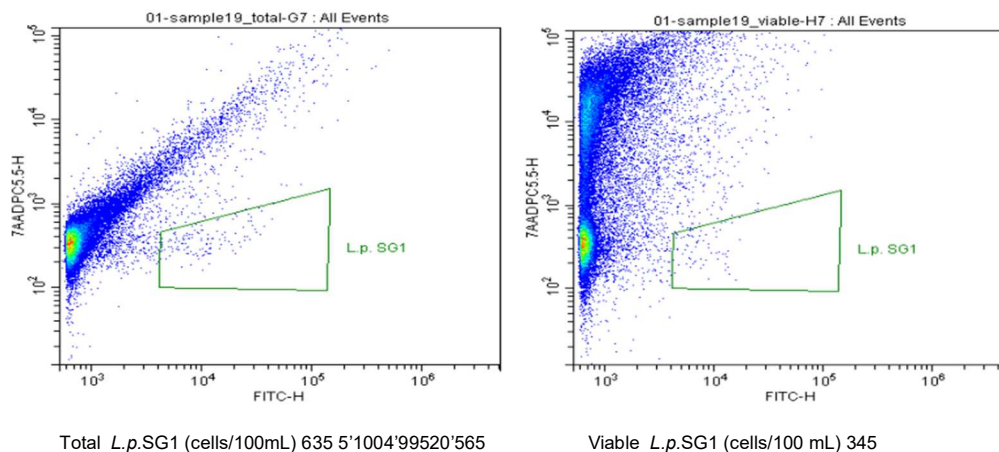


Total *L.p.SG1* (cells/100mL) 5 100 5'1004'99520'565



Viable *L.p.SG1* (cells/100 mL) 2 645

Próbka nr 19



Tab. 5

Podsumowanie otrzymanych wyników badania *L. pneumophila* z otrzymanych próbek wody.

Nr próby	Typ analizy	Total count wg FCM/ 100 mL	Viable count wg FCM/ 100 mL	Viability FCM (%)	Jednostki genomowe qPCR/100mL	wg
1	L.p. SG1	1'045	470	45.0%	8400	
2	L.p. SG1	505	160	31.7%	6240	
3	L.p. SG1	1'785	310	17.4%	11200	
4	L.p. SG1	335	85	25.4%	5720	
5	L.p. SG1	385	90	23.4%	5520	
6	L.p. SG1	480	275	57.3%	5800	
7	L.p. SG1	520	290	55.8%	6400	
8	L.p. SG1	545	295	54.1%	6480	
9	L.p. SG1	0	0	0.0%	0	
10	L.p. SG1	0	0	0.0%	0	
11	L.p. SG1	0	0	0.0%	0	
12	L.p. SG1	20'565	9'645	46.9%	21200	
13	L.p. SG1	4'995	3'600	72.1%	14400	
14	L.p. SG1	0	0	0.0%	0	
15	L.p. SG1	0	0	0.0%	0	
16	L.p. SG1	165	110	66.7%	5200	
17	L.p. SG1	680	490	72.1%	5600	
18	L.p. SG1	5'100	2'645	51.9%	14800	
19	L.p. SG1	635	345	54.3%	56400	

DYSKUSJA I WNIOSKI

Porównując metodę immunoseparacji (IMS) połączoną z analizą na cytometrze przepływowym (FCM) z metodą real-time PCR (qPCR) można sformułować następujące wnioski:

- Metoda (IMS&FCM) jest najbardziej zbliżona do metody klasycznej uznanej za standard oznaczania *Legionella spp* zgodnie z normą nr PN-EN ISO 19457:2007 I PN ISO 11731:2002.
- Metoda (IMS&FCM) pozwala w sposób jednoznaczny rozróżnić komórki żywe i martwe występujące w analizowanej próbce środowiskowej.
- W stosunku do metody standardowej procedurę (IMS&FCM) można wykonać w ciągu 2 godzin od dostarczenia próbek do laboratorium. Metoda cechuje się wysokim stopniem automatyzacji oznaczania próbek, co pozwala na przeprowadzenie dziesiątków oznaczeń próbek środowiskowych w czasie jednego dnia.
- Wysoka przepustowość omawianej metody powoduje radykalne obniżenie kosztów oznaczania *Legionella spp.* w próbkach środowiskowych. Według cen oznaczania *Legionella spp.* w roku 2018 średni koszt jednej próby wynosi 300 zł. Metoda (IMS&FCM) pozwala obniżyć koszt oznaczenia do 86 zł za jedną próbę.
- W przypadku metody qPCR szybkość oznaczania bakterii *Legionella* w próbkach środowiskowych jest porównywalna z metodą (IMS&FCM) lecz pojawiają się znaczne trudności w interpretacji uzyskanych wyników polegające na:
 - ✓ konieczności, każdorazowej kalibracji wyników w oparciu o krzywą zależności jednostki



- tworzące kolonie (jtk) a jednostki genomowe (jgm),
- ✓ uzyskane wyniki w metodzie qPCR dotyczą zarówno materiału genetycznego z martwych, jak i żywych komórek *Legionella spp.* co może utrudniać określenie stopnia podjętych działań reparacyjnych w przypadku stwierdzenia wystąpienia w próbkach pobranej wody poziomu *Legionella spp.* powyżej 100 jtk/100 ml.

W przypadku wystąpienia epidemii Legionelozy, szybkie i jednoznaczne określenie źródła infekcji oraz natychmiastowe podjęcie czynności naprawczych jest warunkiem niezbędnym do ograniczenia i zminimalizowania skutków rozwijającej się epidemii.

Wytyczne PZH, co do poziomu ilości bakterii z rodzaju *Legionella* w badanej wodzie, zawarte w opracowaniu z 2001 roku na temat Metodyki wykrywania i oznaczania bakterii z rodzaju *Legionella* w środowisku wodnym i materiale klinicznym są następujące:

- < 10³ komórek bakteryjnych z rodzaju *Legionella* w 1 l wody – system prawidłowo eksploatowany.
- 10³ – 10⁴ komórek bakteryjnych z rodzaju *Legionella* w 1 l wody – poziom ostrzegawczy, należy powtórzyć badanie.
- > 10⁴ komórek bakteryjnych z rodzaju *Legionella* w 1 l wody – powtórzyć badanie i równocześnie przystąpić do działań interwencyjnych włącznie z czyszczeniem i dezynfekcją systemu.
- W przypadku wykrycia obecności *Legionella pneumophila* zawsze należy przeprowadzić czyszczenie i dezynfekcję systemu.

Według PZH wodę należy badać w budynkach użyteczności publicznej (sanatoria, szpitale, domy opieki społecznej), hotelach i dużych kompleksach mieszkalnych, oraz w systemach wód chłodniczych nie rzadziej jak 2 razy w roku [7].

W klasycznej metodzie oznaczania poziomu *Legionelli* w próbkach wody, skuteczność działania reparacyjnego (podwyższenia temperatury wody w instalacji wodociągowej do 60 °C plus dodatkowe chlorowanie) może być potwierdzone dopiero po 14 dniach !!!

Tylko metoda IMMS&FCM skraca czas oznaczenie *Legionelli* do 2-4 godzin co jest najważniejszym czynnikiem ograniczenia rozwoju epidemii.

LITERATURA

1. Windscreen wiper fluid without added screenwash in motor vehicles: a newly identified risk factor for legionnaires' disease., Anders Wallensten et al , Eur.J.Epidemiol(2010);
2. PN-EN ISO 19458 2007: Water quality – Taking samples for analysis;
3. PN-ISO 1131:2002 „ Jakość wody – Wykrywanie i oznaczanie bakterii z rodzaju „*Legionella*” PKN 2002;
4. PN-EN ISO 11731 -2:2008 „ Jakość wody”. Wykrywanie i oznaczanie ilościowe bakterii z rodzaju „*Legionella*” – Część 2. Metodyka filtracji membranowej dla wód o małej ilości bakterii PKN 2008;
5. Yuhe Wang, Qi Chen, Chegqi Gan, Bo Yan, Yaguan Han, Jiahan Lin (2016) A Review on Magnetophoretic Immunoseparation, J.Nanosci.Nanotechnol 16, 3, 2152-216;
6. Łukasz Sędek, Alicja Sonsala, Tomasz Szczepański, Bogdan Mazur (2010) Techniczne aspekty cytometrii przepływowej, Diagnostyka laboratoryjna 46,4,415-420;
7. Andrei Shpakou, Iwona Gładysz, Agnieszka Sikora, Małgorzata Wójtowicz-Bobin, Maria Koziol-Montewka (2017), Występowanie bakterii *Legionella spp.* w wybranych obiektach użyteczności publicznej w Polsce w latach 2009-2013, Health problems of Civilization, 11,2,117-123.

dr n. biol. Zbigniew Dąbrowiecki
Zakład Medycyny Morskiej i Hiperbarycznej
Wojskowy Instytut Medyczny
ul. Grudzińskiego 4 81-103 Gdynia 3 skr. poczt. 18
tel: 604291581
e-mail: zdabrowiecki@wim.mil.p