

Transcript - Innovirology session 7.2 Zastosowanie bakteriofagów w diagnostyce mikrobiologicznej

Slajd 1:

Metody diagnostyczne wykorzystujące bakteriofagi są obecnie intensywnie rozwijane i znacznie wykraczają poza proste procedury typowania oraz niektóre techniki powszechnie stosowane w przemyśle. Celem niniejszej prezentacji jest zapoznanie słuchaczy z opartymi o wykorzystanie fagów technikami, umożliwiającymi detekcję patogenów zarówno w żywności, jak i w materiale klinicznym.

Slajd 2:

W zaprezentowanej tabeli zebrane zostały komercyjnie dostępne metody diagnostyczne wykorzystujące bakteriofagi. Pozwalają one na wykrycie czterech patogenów: *Mycobacterium tuberculosis*, *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis* i *Staphylococcus aureus*. Zasadniczo metody te polegają na wykrywaniu pięciu różnych zjawisk towarzyszących prawidłowo przebiegającej infekcji fagowej: 1. Zwiększenie liczby cząstek fagowych, 2. Ekspresja genów reporterowych, 3. Amplifikacja fagowego materiału genetycznego, 4. Produkcja fagowych białek strukturalnych (detekcja z wykorzystaniem spektrometrii mas), 5. Produkcja konkretnych białek bakteriofagowych (detekcja z wykorzystaniem testów dot blot).

Zgodnie z tabelą, każda z wymienionych metod posiada swoją unikalną specyfikę, obejmującą typ badanego materiału (od próbek krwi po czyste kultury bakteryjne), przybliżony czas detekcji (od 2 do 48 godzin) oraz czułość samego testu (najczulsze wykrywają nawet 100 cfu/ml).

Parametry te wskazują, że metody diagnostyczne oparte o wykorzystanie bakteriofagów znacznie przewyższają metody konwencjonalne, zarówno pod kątem czułości, jak i szybkości działania. Dokładną charakterystykę omawianych technik znaleźć można w publikacji Schofield i wsp.

Slajd 3:

Metody diagnostyki oparte na bakteriofagach znajdują również zastosowanie w detekcji patogenów w żywności. Ze względu na potencjalne ryzyko zatrucia, przemysł spożywczy podlega niezwykle restrykcyjnym przepisom sanitarno-epidemiologicznym. Wnikliwa kontrola bakteriologiczna na każdym etapie produkcji żywności jest niezbędna, zwłaszcza w kontekście wciąż rosnącego spożycia produktów gotowych, które dzięki globalizacji, dystrybuowane są w wielu krajach świata.

Stosowane obecnie konwencjonalne metody wykrywania patogenów w żywności są zazwyczaj powolne i niewydajne. Przykładowo określenie liczby bakterii beztlenowych zajmuje zwykle 72 godziny. Tak powolna diagnostyka skutkuje opóźnieniami w produkcji, zwiększa wykorzystanie przestrzeni magazynowej oraz spowalnia reakcję w przypadku potencjalnych masowych zatruc. Ponadto, metody konwencjonalne są bardziej pracochłonne, wymagają większej ilości wykwalifikowanych pracowników oraz pochłaniają dużą ilość materiałów eksploatacyjnych.

Rozwój diagnostyki opartej na bakteriofagach rozwiązuje wiele problemów metod konwencjonalnych i pozwala na stworzenie szybkich i niezawodnych procedur wykrywania najczęściej występujących w żywności patogenów, np. *E. coli*, *Salmonella sp.*, *Campylobacter sp.* czy *Listeria monocytogenes*.

Jedną z tego typu technologii jest system VIDAS, który jest zdolny do automatycznego wykrywania rozmaitych patogenów przy użyciu rekombinowanych białek fagowych.

Slajd 4:

Technologia VIDAS wykorzystuje zakotwiczone w podłożu przeciwciała, których fragment Fc zawiera rekombinowane białka fagowe, zdolne do specyficznego rozpoznania patogenów. Umożliwia to uwięzienie rozpoznanego drobnoustroju i, w następnym kroku, opłaszczenie go specyficznymi przeciwciałami skoniugowanymi z enzymami. Produkty reakcji enzymatycznej są w łatwy sposób wykrywane, a na podstawie intensywności odbieranego sygnału możliwe jest określenie ilości bakterii w badanej próbce.

Slajd 5:

Funkcjonalność platformy VIDAS wynika z jej prostoty – badanie przeprowadzane jest przez dedykowane urządzenie wykorzystujące gotowe paski (prawa górna rycina i środkowy schemat). Po wstępnej 18-24 godzinnej inkubacji, próbka wprowadzana jest do paska testowego, po czym specjalna końcówka pipetująca, opłaszczona przeciwciałami ze zmodyfikowanym fragmentem Fc (zawierającym rekombinowane białka fagowe) pobiera badaną próbkę w celu wychwycenia potencjalnych patogenów. Kolejne dołki paska testowego wykorzystywane są w celu przepłukiwania końcówki pipetującej oraz wprowadzenia przeciwciał drugorzędowych, skoniugowanych z enzymem. Całkowity czas od wprowadzenia próbki, do odczytu efektu reakcji enzymatycznej trwa 48 minut, co czyni technikę VIDAS znacznie szybszą i tańszą (niższy nakład pracy, mniejsze zużycie odczynników) od metod tradycyjnych.

Slajd 6:

Obecnie, poza systemem VIDAS, rozwijanych jest wiele innych technologii, wykorzystujących bakteriofagi w celu detekcji bakterii. Te z nich, które opierają się o amplifikację fagów, bądź fagi reporterowe, zostały już omówione wcześniej. Pozostałe metody związane są z pomiarem markerów wydzielanych przez bakterie w trakcie infekcji (np. uwalnianie cząsteczek ATP w trakcie lizy komórki) lub wykorzystują bakteriofagi jako wysoko specyficzne komponenty biosensorów. W celu dokładnego zapoznania się z tym zagadnieniem warto zapoznać się z publikacjami Schmelchera i Loessnera.

Slajd 7:

Komponentami cząstek fagowych często używanymi do detekcji i specyficznego rozpoznawania bakterii Gram-dodatnich są niektóre domeny endolizyn, odpowiedzialne za wiązanie ze ścianą komórkową. Dyskutowana tutaj publikacja ukazuje proces optymalizacji biblioteki białek fuzyjnych, złożonych z podjednostek fluorescencyjnych i domen wiążących ścianę komórkową (pochodzących z różnych klas endolizyn fagów specyficznych dla rodzaju *Listeria*). Dzięki selekcji pod kątem wysokiej swoistości i powinowactwa poszczególnych białek fuzyjnych względem różnych szczepów, możliwe

było opracowanie biblioteki pozwalającej na szybką detekcję i identyfikację szczepów *Listeria sp.*, nawet w heterogennych kulturach.

Slajd 8:

Więcej informacji na temat wykorzystania bakteriofagów w diagnostyce bakteriologicznej znaleźć można w poniższych publikacjach. Załączony odnośnik przekierowuje do filmu obrazującego technologię VIDAS.