

1. Imię i nazwisko

Ewa Maria Kłodzińska

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

2002 – magister chemii, specjalność – chemia środowiska, tytuł pracy dyplomowej: *Techniki elektromigracyjne w oznaczaniu mikroorganizmów*”, promotor: prof. dr hab. Bogusław Buszewski

2007 – doktor nauk chemicznych w dziedzinie chemii, tytuł rozprawy doktorskiej: *„Techniki elektromigracyjne w oznaczaniu mikroorganizmów dla celów diagnostyki medycznej”*, promotor: prof. dr hab. Bogusław Buszewski

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu

1 października 2003 – 31 września 2007 – doktorant w Katedrze Chemii Środowiska i Ekoanalitiky, Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

1 października 2007 – 30 czerwca 2012 – asystent w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky, Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

1 lipca 2012 – nadal – adiunkt w Instytucie Inżynierii Materiałów Polimerowych i Barwników w Toruniu

4. Zainteresowania naukowe

Techniki elektromigracyjne, mikrobiologia, infekcja miejsca operowanego, chromatografia gazowa, polimery biobójcze

5. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art.16 ust.2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz.595 ze zm.)

5.1. Tytuł osiągnięcia

Nowe rozwiązania metodyczne w elektroforezie kapilarnej dla potrzeb diagnostyki medycznej patogenów

(Osiągnięcie stanowi jednotematyczny cykl publikacji od H1 do H9, wymienionych w Załączniku 2A i których kopie znajdują się w Załączniku 4)

5.2. Autoreferat wraz z omówieniem osiągnięcia naukowego

W 2002 roku ukończyłam studia magisterskie na Wydziale Chemii UMK w Toruniu. Praca dyplomowa, wykonana pod kierunkiem prof. dr. hab. Bogusława Buszewskiego, dotyczyła wykorzystania technik elektromigracyjnych w oznaczaniu mikroorganizmów. Praca ta stanowiła nowość naukową, nie tylko w Polsce, lecz również na świecie, gdyż niewiele grup badawczych zajmowało się tą tematyką. Niewiele było również doniesień literaturowych w obrębie tego zagadnienia. Wyniki mojej pracy magisterskiej zostały zaprezentowane na konferencji w Bratysławie oraz

Paryżu i w 2003 roku ukazała się pierwsza nasza publikacja w renomowanym czasopiśmie naukowym (J.Sep.Sci) [1]. Publikacja ta była pierwszym na świecie przykładem wykorzystania modyfikacji chemicznej powierzchni kapilar kwarcowych (*fused silica*) do separacji komórek bakterii [1].

W 2003 roku, po rocznej przerwie od ukończenia studiów, związanej z wychowywaniem dziecka, zdałam egzaminy wstępne i zostałam słuchaczem Studium Doktoranckiego na Wydziale Chemii UMK. W listopadzie 2003 roku wzięłam udział w kursie „*Miniaturised Chemical Systems*” organizowanym na Politechnice Warszawskiej i kontynuowałam badania dotyczące separacji bakterii w polu elektrycznym. W roku 2004 wygłosiłam swój pierwszy wykład na Forum Analitycznym w Warszawie oraz odbyłam dwutygodniowy kurs „*Summer School on Separation Methods*” w ramach programu Ceepus w Bratysławie, a w roku 2005 kurs „*Advances in HPLC Method Development*” w Pardubicach. Wszystkie kursy potwierdzone zostały certyfikatami.

W latach 2004-2006 uzyskałam na swoje badania grant promotorski UMK dotyczący optymalizacji warunków separacji bakterii przy użyciu technik elektromigracyjnych oraz byłam głównym wykonawcą grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (N20416531/3730), nt: „Techniki elektromigracyjne jako nowe podejście do diagnostyki *Helicobacter pylori*”. W tym czasie miałam już skompletowany niezbędny warsztat badawczy pozwalający na realizację zaplanowanych celów. Do momentu złożenia przeze mnie rozprawy doktorskiej opublikowaliśmy siedem prac w renomowanych czasopismach z tzw. listy filadelfijskiej [1-7] (łącznie IF = 16.2). Wygłosiłam osobiście 16 komunikatów i referatów na konferencjach o zasięgu międzynarodowym. W 2005 roku byłam członkiem grupy nagrodzonej przez Ministra Edukacji Narodowej i Sportu za opracowanie, pt.: „*Mikrokolumny i wypełnienia do chromatograficznego rozdzielania związków biologicznie ważnych. Preparatyka, charakterystyka i zastosowanie*”, natomiast w latach 2006, 2007 otrzymałam Stypendium Marszałka Województwa Kujawsko-Pomorskiego. Byłam też członkiem grupy nagrodzonej przez **Fundację na Rzecz Nauki Polskiej** w ramach subsydium profesorskiego „Mistrz” przyznanego prof. dr. hab. Bogusławowi Buszewskiemu za opracowanie nt. „*Nowej generacji mikro- i nanoukłady do oznaczania związków biologicznie aktywnych i mikroorganizmów za pomocą technik separacyjnych*”. Wyniki prac prezentowane przeze mnie w formie prezentacji plakatowej niejednokrotnie były wyróżniane nagrodą za najlepszy poster.

Wspomniany przeze mnie zbiór publikacji naukowych [1-7] złożył się na przygotowanie pod kierunkiem prof. dr. hab. Bogusława Buszewskiego rozprawy doktorskiej zatytułowanej: „*Techniki elektromigracyjne w oznaczaniu mikroorganizmów do celów diagnostyki medycznej*”, którą z wyróżnieniem obroniłam 17 października 2007 roku. Rok później za swój dorobek naukowy uzyskałam stypendium Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej w programie „Start” a w kolejnym roku otrzymałam jego przedłużenie.

Podczas przygotowywania rozprawy doktorskiej podjęłam się realizacji wyznaczonych celów poprzez:

- oznaczanie bakterii za pomocą elektroforezy kapilarnej przy użyciu niemodyfikowanej mikrokolumny kwarcowej (*fused silica*),
- dobór warunków analizy komórek bakteryjnych w zakresie różnych wartości pH i stężeń roztworu buforowego oraz różnych wartości przykładanego napięcia, a także badanie wpływu dodatku poli(tlenku etylenu) (ang. *poly(ethylene oxide) – PEO*) na otrzymane wyniki,
- oznaczenie ruchliwości elektroforetycznych wybranych szczepów bakterii oraz ich identyfikację za pomocą widm, czasów migracji i ruchliwości elektroforetycznych w warunkach modyfikacji dynamicznej kwarcowych mikrokolumn,
- opracowanie metodyk przygotowania mieszanin polimeryzacyjnych – modyfikacja chemiczna w tym modyfikacje typu „*tube-in-the-tube*”,
- syntezę złożeń monolitycznych o pożądanej porowatości (pory przepływowe) oraz ocenę jakości wypełnienia kolumny kapilarnej,
- zastosowanie opracowanych procedur do oznaczania wybranych klinicznych szczepów bakterii *H. pylori*, *E. coli*, *S. aureus* w materiałach biologicznych (mocz, wycinki błony śluzowej żołądka, zainfekowane tkanki) oraz preparacie farmaceutycznym,

W 2008 roku moja rozprawa doktorska została wyróżniona Nagrodą im. Aleksandra Zamojskiego za najlepszą rozprawę doktorską podczas Zjazdu PTChem w Opolu. Brałam również udział w prestiżowym spotkaniu Laureatów Nagrody Nobla z dziedziny chemii, dzięki konkursowi ogłoszonemu przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej (Lindau, Niemcy).

Biorąc pod uwagę dostępne instrumentarium, jakie stanowi połączenie elektroforezy kapilarnej wraz z obserwacją mikroskopową, technik molekularnych oraz technik dwuwymiarowych, postanowiłam w dalszej części mojej działalności naukowej nadal zgłębiać zagadnienia związane z separacją bakterii w polu elektrycznym oraz wykorzystać zdobyte przez kilka lat doświadczenie do poszukiwania aplikacyjnych możliwości opracowanych procedur. Po konsultacji w Wojewódzkim Szpitalu Zespolonym Kliniki Chirurgii Ogólnej, Gastroenterologicznej i Onkologicznej CM UMK w Toruniu, postanowiłam zająć się bardzo istotnym i trudnym, zwłaszcza dla pacjentów, problemem związanym w infekcją ran pooperacyjnych po wycięciu guzów nowotworowych oraz patogenami wywołującymi nowotwory układu pokarmowego. Wymagało to z mojej strony poszerzenia wiedzy, w szczególności medycznej z zakresu analityki miejsca operowanego. Najważniejszym jednak aspektem było zaprojektowanie stanowiska badawczego oraz optymalizacja (dobór) warunków prowadzenia analiz elektroforetycznych w tak skomplikowanych matrycach (próbki zawierały najczęściej elementy morfotyczne tkanek, krew, żółć, ropę). Należy tutaj wspomnieć, iż na wszystkie badania wydana została zgoda komisji bioetycznej.

Dzięki specyficznej budowie ścian komórkowych związanej z obecnością charakterystycznych grup funkcyjnych pochodzących

z peptydoglikanu, kwasów tejchojowych czy lipo polisacharydu, bakterie obdarzone są ujemnym ładunkiem powierzchniowym [H1]. Ładunek ten determinuje tworzenie dwuwarstwy elektrycznej oraz powstawanie potencjału zeta. Z tymi parametrami natomiast ściśle powiązane są zdolności adhezyjne i kolonizacyjne bakterii do różnych powierzchni, w tym błon śluzowych i tkanek.

Pierwsze doniesienia z zakresu wykorzystania elektroforezy kapilarnej do oznaczania bakterii zostały opublikowane przez S. Hjertena i współpracowników w 1987 roku [9]. Opisali oni migrację wirusa mozaiki tytoniowej oraz bakterii *Lactobacillus casei* w 20 mM buforze Tris-HCl, ale nie uzyskali separacji. Bakterie migrowały wraz z przepływem elektroosmotycznym i zachowywały się jak cząstki nieposiadające ładunku na swojej powierzchni. W 1993 roku Ebersole i McCormick [10] rozdzielili cztery gatunki bakterii w buforze TBE i pH = 9.5 oraz udowodnili, zbierając poszczególne frakcje po procesie elektroforezy, iż większość bakterii (80%) jest żywa. Rok później Torimura [11] opublikował pracę dotyczącą elektroforetycznego zachowania się dziewięciu gatunków bakterii, wyznaczając ich ruchliwości elektroforetyczne. W latach dziewięćdziesiątych również Pfetsch i Welsch [12] oraz Glynn [13] wyznaczyli ruchliwości elektroforetyczne bakterii w różnych roztworach buforowych i stwierdzili ich spadek wraz ze wzrastającą siłą jonową.

W 1999 roku Armstrong i współpracownicy [14] wprowadzili poli(tlenek etylenu) znany wcześniej z separacji białek. Dodatek PEO do roztworów buforowych powodował spowolnienie przepływu elektroosmotycznego oraz niwelował w znaczący sposób adhezję komórek bakteryjnych do powierzchni wewnętrznej kapilar. Ta sama grupa badawcza zaproponowała trzy możliwe mechanizmy migracji bakterii w polu elektrycznym z wykorzystaniem PEO oraz mechanizm tworzenia aglomeratów przez komórki bakteryjne [15]. Zeng i Yeung [16] wykorzystali natomiast kamerę CCD do wizualizacji agregacji komórek i zaobserwowali, iż poruszają się one w różnych kierunkach wraz z różną szybkością w zależności od wielkości utworzonych aglomeratów. Zbadali oni również wpływ działania ultradźwięków przed samą analizą elektroforetyczną.

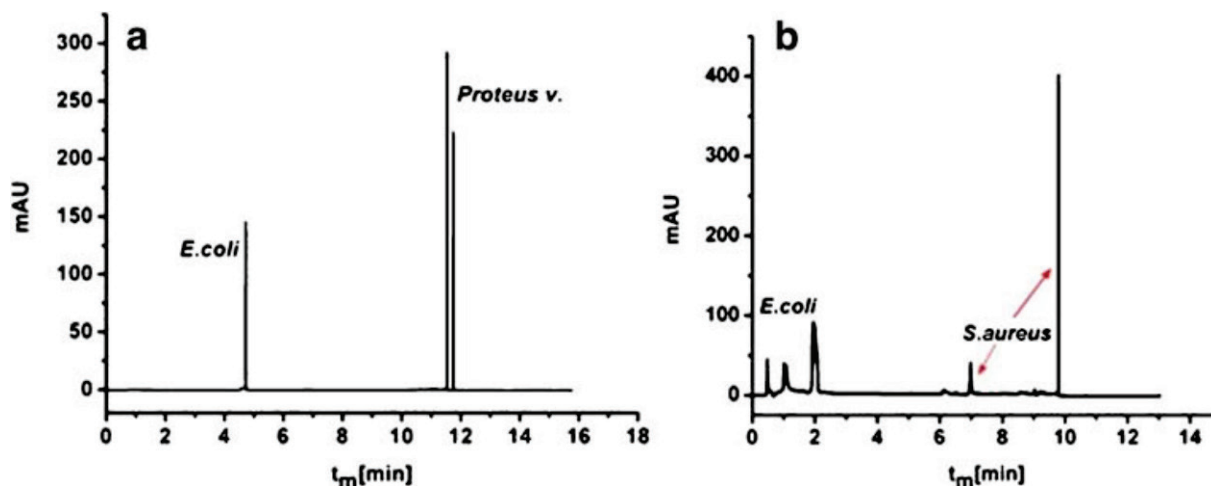
Biorąc pod uwagę dane literaturowe oraz zdobyte doświadczenie własne i współpracowników z Katedry Chemii Środowiska i Bioanalitiky, kierowanej przez prof. dr hab. Bogusława Buszewskiego jako cel badawczy postawiłam:

- ✓ zgłębienie procesu separacji bakterii (modyfikacje chemiczne powierzchni kapilar);
- ✓ poznanie procesu powstawania aglomeratów przez komórki bakteryjne;
- ✓ pomiar potencjału zeta oraz korelacja z danymi elektroforetycznymi;
- ✓ opracowanie metodyki oznaczania komórek bakterii w próbkach biologicznych;
- ✓ ocenę wpływu terapii antybiotykowej na komórki bakterii za pomocą elektroforezy kapilarnej – oszacowanie ilości bakterii podczas prowadzenia leczenia;

- ✓ wykonanie i interpretację profili tygodniowych dla pacjentów po różnych typach operacji chirurgicznych (stopa cukrzycowa, guz jelita grubego, kamica nerkowa);

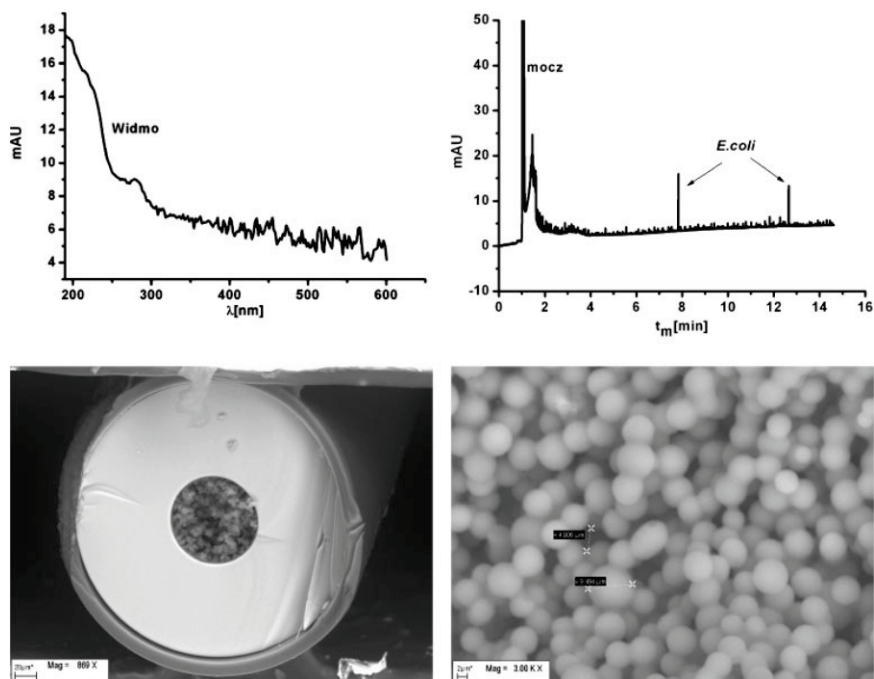
Finalnie zaproponowane procedury mają mieć zastosowanie jako szybki test służący do „skryningowej” – przesiewowej identyfikacji wybranych czynników etiologicznych objawowych infekcji ran pooperacyjnych. Test ten ma za zadanie w krótkim czasie określić, czy rozwija się infekcja pooperacyjna czy nie, a jeśli są obecne w badanej próbce bakterie, czy są one Gram-dodatnie czy Gram-ujemne. Jest to obecnie najszybsza informacja dla lekarza przed wprowadzeniem wyniszczającej organizm terapii antybiotykowej. Wówczas, dalsze szczegółowe badania wskazujące na konkretny szczep bakterii mogą być prowadzone bez ryzyka wprowadzania niejednokrotnie zbędnej terapii.

W technikach elektromigracyjnych główną siłą napędową jest przepływ elektroosmotyczny, czyli ruch buforu (elektrolitu) w kapilarze (EOF – *electroosmotic flow*). Zależy on od ładunków elektrycznych, które są rozłożone na ściankach kapilary. Opierając się na danych literaturowych oraz doświadczeniach własnych można jednoznacznie stwierdzić, iż dla pewnych analiz korzystniejsze jest spowolnienie przepływu elektroosmotycznego, bądź jego eliminacja. Przy użyciu kapilary kwarcowej (*fused silica*) nie udało się, bowiem dokonać separacji mieszaniny mikroorganizmów. Bakterie migrowały wraz z przepływem elektroosmotycznym i zachowywały się jak cząstki, które nie posiadają ładunku elektrycznego na powierzchni. Na elektroferogramie otrzymywano za każdym razem jeden pik, będący najprawdopodobniej mieszaniną różnych bakterii lub piki słabo, bądź w ogóle nierozdzielone [H1]. Ponadto, ruchliwości elektroforetyczne oraz czasy migracji różnych bakterii nie różniły się między sobą i można było zaobserwować silną adhezję komórek bakteryjnych do wewnętrznej powierzchni kapilary. Zjawisko adhezji komórek bakteryjnych do powierzchni kapilar praktycznie uniemożliwia separację, nie dając żadnej konkretnej informacji o składzie analizowanej próbki. Sytuacja ta ulega znacznej poprawie, gdy stosuje się dynamiczną modyfikację kapilar kwarcowych poprzez dodatek 0,0125% PEO do elektrolitu podstawowego (Rys.1.) [H1-H4]. Dodatek ten powoduje skupianie się komórek w polu elektrycznym i pozwala na migrację bakterii w wąskich strefach. Również zastosowanie odpowiednich roztworów buforowych, takich jak TBE, czy fosforanowy z dodatkiem specyficznych jonów, które mogą selektywnie oddziaływać z powierzchnią komórek bakteryjnych, pozwala na uzyskanie separacji i identyfikacji poszczególnych gatunków bakterii w próbkach klinicznych oraz w preparacie farmaceutycznym [H1-H4].



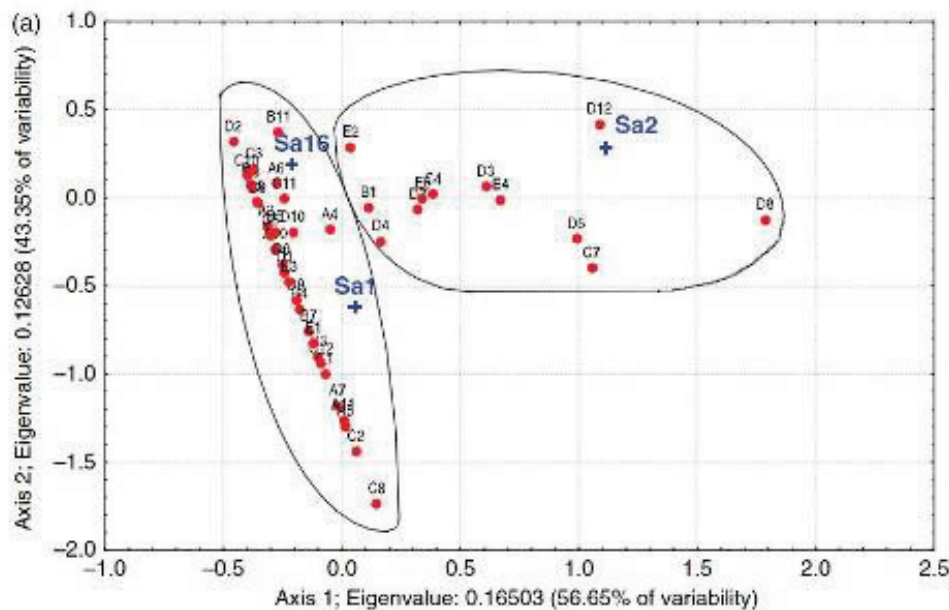
Rysunek.1. Przykładowa separacja dwóch gatunków bakterii przy użyciu kapilary modyfikowanej dynamicznie za pomocą dodatku PEO do roztworu buforowego (szczegóły publikacja **H1**)

W celu polepszenia selektywności, spowolnienia przepływu elektroosmotycznego oraz zablokowania grup silanolowych na powierzchni kapilary przeprowadziłam modyfikację chemiczną wewnętrznej ściany kapilary za pomocą akryloamidu oraz wytworzyłam monolityczną kolumnę kapilarną na bazie styrenu i diwinylobenzenu [**H2**]. Kapilary te wykorzystałam do rozdzielania klinicznych szczepów bakterii *S. aureus* oraz do oznaczenia komórek *E. coli* w moczu pobranym od pacjenta (Rys.2).



Rysunek 2. Zdjęcia wykonane za pomocą mikroskopu elektronowego wytworzonej kolumny monolitycznej oraz elektroferogram próbki moczu z komórkami *E. coli* (szczegóły publikacja **H2**)

Kolejnym etapem prowadzonych przeze mnie badań było wykorzystanie elektroforezy kapilarnej do separacji trzech szczepów bakterii *S. aureus* oraz metod biologii molekularnej do weryfikacji przynależności gatunkowej i szczepowej. W ten sposób chciałam wykazać możliwości, jakie daje elektroforeza kapilarna w oznaczaniu różnych szczepów bakterii tego samego gatunku [H3]. Szczepy gronkowca złocistego oznaczone odpowiednio Sa1, Sa2 i Sa3 zostały wyizolowane z przegrody nosowej, rany pooperacyjnej oraz owrzodzenia żołądka. Następnie zostały one zróżnicowane za pomocą testu BIOLOG, który opiera się na wykorzystaniu przez komórki bakteryjne różnych źródeł węgla. Dodatkowo produkty reakcji PCR zostały pocięte za pomocą enzymów restrykcyjnych (ALuI, EcoRI, HaeIII i TaqI) i rozdzielone w 3% żelu agarozowym [H3]. Zarówno amplifikacja, jak i sekwencjonowanie genu 16SrRNA trzech szczepów gronkowca pozwoliło na ich identyfikację i potwierdziło w 100 % zgodność ze szczepem odniesienia z bazy danych GenBank (*S. aureus* ATCC 14458 (Accession number DQ997837; GenBank, NCBI). Jednakże dodatkowa analiza fizjologiczna, jaką był test na odporność na antybiotyki oraz analiza głównych składowych (CA) dla różnych źródeł węgla ukazały zupełnie inne właściwości trzech analizowanych szczepów (Rys.3.)



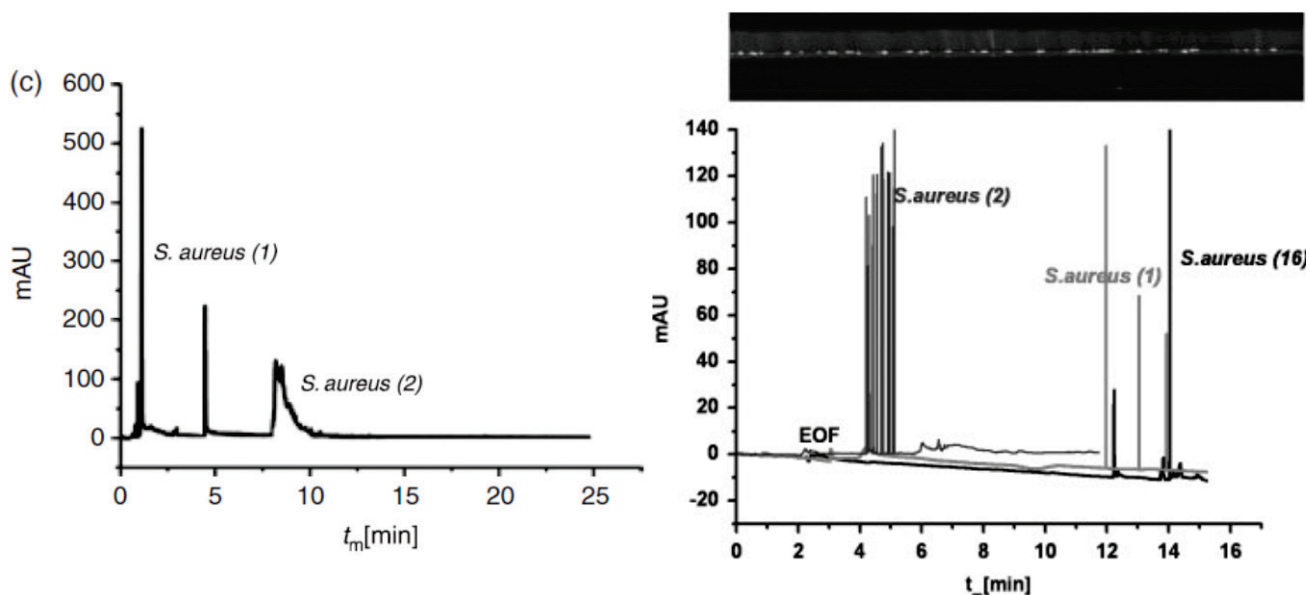
Rysunek 3. Analiza CA porównująca zużycie różnych źródeł węgla przez komórki *S. aureus* (1, 2, 16) [H3]

Dzięki analizie porównawczej stwierdzono podobieństwo między szczepami Sa1 i Sa16. Aby potwierdzić te wyniki wszystkie trzy szczepy zostały poddane różnicowaniu za pomocą reakcji PCR oraz zostały finalnie rozdzielone za pomocą elektroforezy żelowej (Tabela 1) [H3].

Tabela 1. Porównanie szczepów *S. aureus* (1,2 i 16) [H3]

Bacterial strain and Accession number	PCR product (approximate bp)	Presence of restriction digest fragment of the following size bp			
		AluI	EcoRI	HaeIII	TaqI
<i>S. aureus</i> 1 (EU490368)	850	700	850	420	650, 850
<i>S. aureus</i> 2 (EU490369)	720	680, 400, 350	720	400, 320	720, 520
<i>S. aureus</i> 16 (EU490370)	850	700	850	420	650, 850

Elektroforetycznie udało mi się rozdzielić dwa szczepy komórek gronkowca (Sa1 i Sa2). Szczep gronkowca oznaczony jako Sa16 charakteryzował się takim samym czasem migracji jak szczep Sa1, co świadczy o tym, iż biorąc pod uwagę ładunek powierzchniowy szczepy te są identyczne (Rys.4.)[H3].



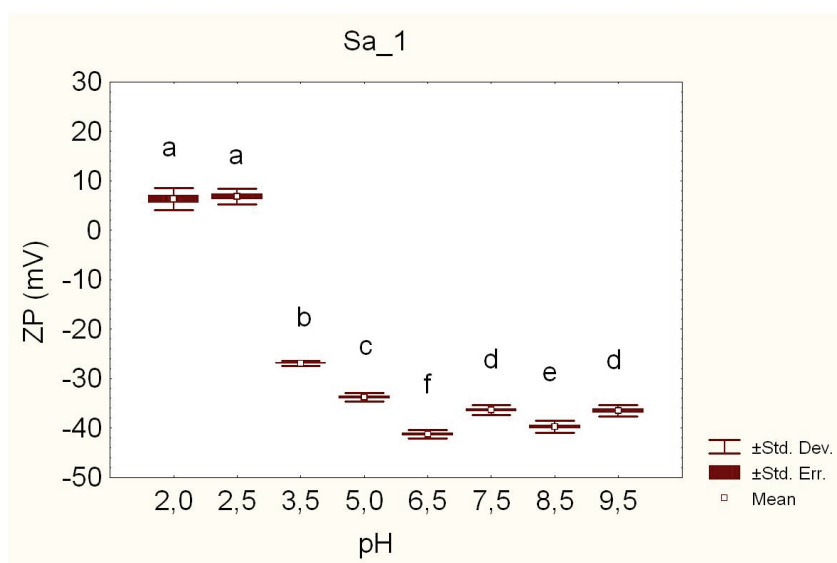
Rysunek 4. Separacja elektroforetyczna dwóch szczepów *S. aureus* [szczegóły publikacja H3] oraz nałożone elektroferogramy dla trzech szczepów *S. aureus* [H5]

Takie same wnioski uzyskano wykorzystując techniki biologii molekularnej, co świadczy o dobrej selektywności i skuteczności zaproponowanej elektroforetycznej metody oznaczania komórek bakteryjnych w obrębie różnych szczepów tego samego gatunku [H3].

W kolejnym etapie prowadzonych przez mnie badań skupiłam się na oszacowaniu ładunku powierzchniowego komórek bakteryjnych za pomocą pomiaru potencjału zeta. Dzięki temu można bowiem wyjaśnić zjawisko agregacji komórek bakteryjnych podczas elektroforezy oraz silną adhezję do powierzchni kapilar kwarcowych. Zjawiska te odgrywają kluczową rolę w bioinżynierii, medycynie i biotechnologii. Powodowane są one w głównej mierze przez ładunek obecny na powierzchni komórek bakteryjnych, jednakże istotną rolę odgrywa również hydrofobowość, skład ściany komórkowej, właściwości powierzchni stałych oraz wiele parametrów związanych ze środowiskiem reakcji, np.: siła jonowa, stężenie roztworów buforowych i wartość pH. Obecność ładunku elektrycznego na powierzchni mikroorganizmów ma zatem bezpośredni wpływ na agregację i adhezję

do powierzchni stałych, jak również może posłużyć jako parametr umożliwiający rozróżnienie poszczególnych szczepów bakteryjnych. Właściwości elektryczne komórek bakteryjnych mogą być więc scharakteryzowane na podstawie pomiarów potencjału zeta, który jest potencjałem elektrycznym wytwarzanym między roztworem a warstwą stałą (powierzchnia kapilar, faza stacjonarna).

Kontynuując badania dla wybranych wcześniej klinicznych szczepów gronkowca wyznaczyłam potencjał zeta dla wszystkich trzech bakterii. Pomiary potencjału zeta wykonałam dla ośmiu różnych wartości pH roztworów buforowych (pH 2.0; 2.5; 3.5; 5.0; 6.5; 7.5; 8.5; 9.5) (Fig. 5) [H5]. Najczęściej na elektroferogramie otrzymuje się liczne sygnały pochodzące od klastrów komórek bakteryjnych charakteryzujące się potencjałem zeta w przedziale: $\zeta = 12\text{mV}$ dla pH=2.0, $\zeta = -41\text{ mV}$ dla pH =6.5 do $\zeta = -37$ dla pH = 9.5. Największe różnice pomiędzy szczepami Sa1, Sa2 i Sa16 można zaobserwować dla wartości w przedziale pH = 2.5 – pH = 7.5. Punkty izoelektryczne dla wszystkich trzech szczepów *S. aureus* są w przedziale pH = 2.0 – pH = 4, co jest zgodnie z danymi literaturowymi [H5]. Przeprowadzenie tych eksperymentów potwierdziło moje przypuszczenia, iż istnieje możliwość rozróżnienia komórek bakteryjnych na podstawie ich potencjału powierzchniowego. Dlatego w kolejnym etapie prowadzonych przeze mnie badań postanowiłam kontynuować zagadnienie związane z potencjałem zeta dla bakterii.



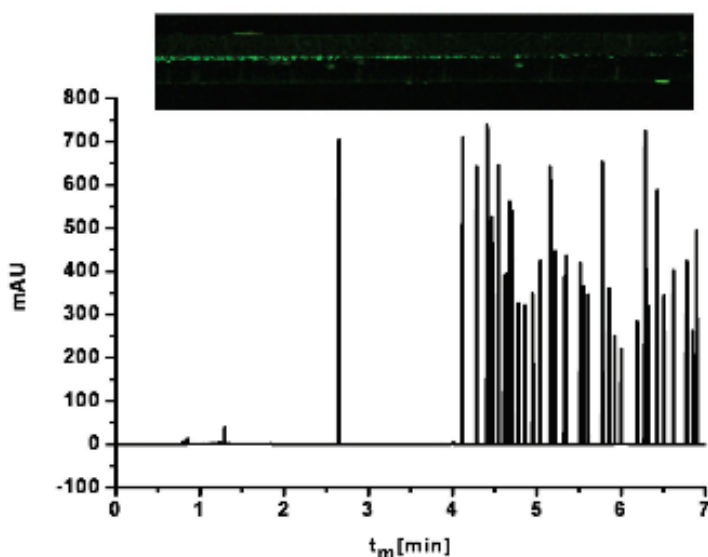
Rysunek 5. Przykładowa wartości potencjału zeta dla szczepu bakterii Sa1 w funkcji wartości pH roztworów buforowych [szczegóły w publikacji H5]

Opierając się na powyższych danych można wysnuć wniosek, iż powierzchnia komórek bakteryjnych jest wysoce skomplikowaną strukturą, ładunek powierzchniowy różni się znacznie w zależności od czynności życiowych mikroorganizmów, warunków życia, wartości pH i siły jonowej. Potencjał zeta różni

się również u bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, co jest bardzo użytecznym parametrem przy rozróżnianiu gatunków bakterii [H5, H6].

Biorąc pod uwagę powyższe wykonałam serie pomiarów potencjału zeta dla różnych gatunków bakterii i w różnym stadium życiowym, porównałam potencjał powierzchniowy dla komórek żywych i martwych oraz wykazałam, iż istnieje możliwość rozdzielenia mieszaniny komórek bakteryjnych na podstawie potencjału zeta. Dużym osiągnięciem było porównanie danych uzyskanych z bezpośredniej mikroskopowej obserwacji komórek bakteryjnych w polu elektrycznym podczas prowadzenia analiz elektroforetycznych i późniejsza korelacja z wartościami potencjału zeta [H6].

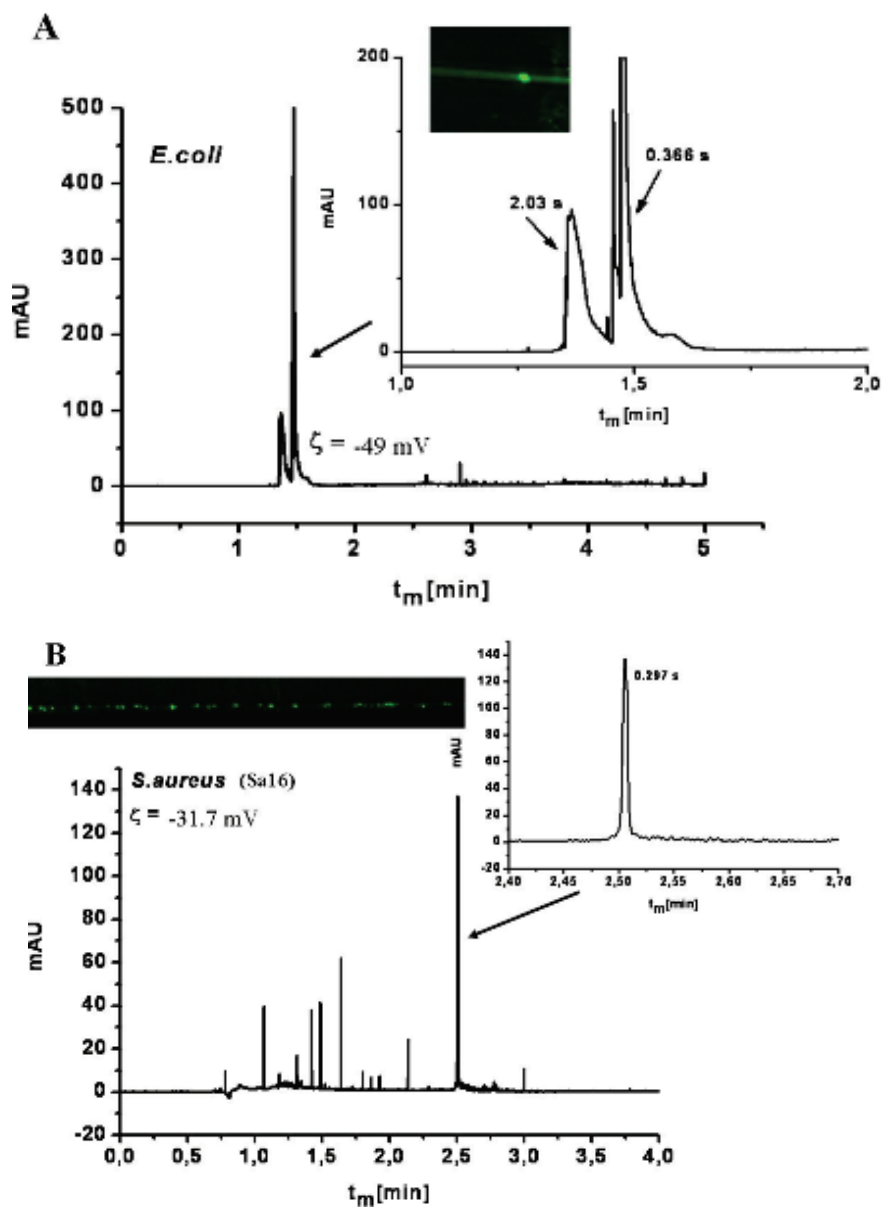
Samoagregacja komórek, jak również adhezja do powierzchni kapilar kwarcowych utrudniała oraz powodowała niską powtarzalność czasów migracji oraz ruchliwości elektroforetycznych. Bardzo często na elektroferogramach uzyskiwano kilkanaście sygnałów pochodzących od jednego gatunku bakterii (Rys. 6).



Rysunek 6. Elektroferogram wraz ze zdjęciem mikroskopowym (widoczne agregaty komórek bakteryjnych) dla bakterii *S. aureus* [H6]

O ile analizie poddawany był jeden gatunek bakterii identyfikacja nie stanowiła problemu, gdyż otrzymywano charakterystyczne widmo UV-Vis dla $\lambda = 214$ nm. Jednakże sytuacja komplikowała się w momencie, gdy analizie poddawane były mieszaniny różnych szczepów bakterii. W celu wizualizacji całego procesu wykorzystywałam opisanie wcześniej połączenie elektroforezy ze stereoskopowym mikroskopem fluorescencyjnym umożliwiające obserwację migrujących stref bakterii podczas elektroforezy [H6, 26]. Dzięki zastosowaniu takiego połączenia można było obserwować zabarwioną na zielono strefę większych, bądź mniejszych agregatów komórek, co bezpośrednio było powiązane z ilością sygnałów uzyskiwanych na elektroferogramach. Klastry widoczne na zdjęciach mikroskopowych i na elektroferogramach charakteryzują się ponadto różnym stosunkiem ładunku do wielkości, co można w łatwy sposób pokazać mierząc

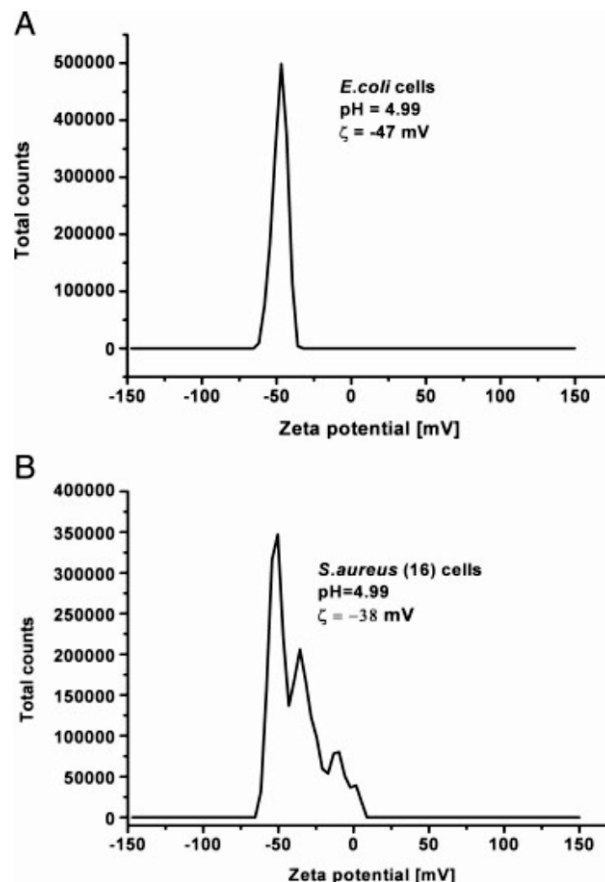
potencjał zeta. W tym konkretnym przypadku wyznaczyłam potencjał zeta dla bakterii *E. coli* oraz trzech różnych szczepów bakterii *S. aureus*. Zaobserwowałam, iż im wyższa jest wartość bezwzględna potencjału zeta, tym mniejsza ilość stref (agregatów) tworzy się podczas analizy w polu elektrycznym. Konsekwencją tego jest oczywiście mniejsza liczba sygnałów na elektroferogramach. Bardzo dobrym przykładem potwierdzającym to stwierdzenie jest elektroforeza komórek *E. coli* (Rys.7A) i *S. aureus* (Rys. 7B) [H6]. Potencjał zeta dla komórek *E. coli* wynosi $\xi = -49$ mV, co jest wartością bardzo wysoką i świadczy o tym, iż utworzony aglomerat jest wysoce stabilny. Ogólna tendencja dotycząca wartości potencjału zeta jest taka, że koloid/aglomerat jest stabilny, gdy wartość bezwzględna potencjału jest większa od ± 30 mV. Dlatego na zdjęciu mikroskopowym można zaobserwować jeden duży klaster utworzony przez komórki *E. coli*, co przekłada się również na uzyskany pojedynczy sygnał na elektroferogramie.



Rysunek 7. Elektroferogramy wraz ze zdjęciem mikroskopowym wykonanym podczas elektroforezy komórek *E. coli* (A) i *S. aureus* (B) [H6]

Zupełnie inną sytuację zaobserwowałam w przypadku komórek *S. aureus*. Gronkowiec jest Gram dodatnią bakterią, której budowa ściany komórkowej znacznie różni się od Gram ujemnej *E. coli*. Posiada on wiele warstw mureiny tworząc symetryczne kulki, których ładunek jest na tyle niewielki, iż komórki się od siebie odpychają (tworzą mniej stabilne aglomeraty). Potencjał zeta dla tej bakterii wynosi $\xi = -31.7$ mV, co jest wartością graniczną, zatem na elektroferogramie, jak również na zdjęciu mikroskopowym obserwujemy znacznie więcej stref migrujących w polu elektrycznym. *S. aureus* tworzy mniej stabilne klastry, a co za tym idzie na elektroferogramie obecna jest duża ilość niewielkich sygnałów (Rys. 7B). Dodatkowo pomiar szerokości pików dla obydwu bakterii świadczy o tym, iż komórki *S. aureus* migrują znacznie szybciej jako małe pojedyncze bądź połączone w mniejsze skupiska klastry.

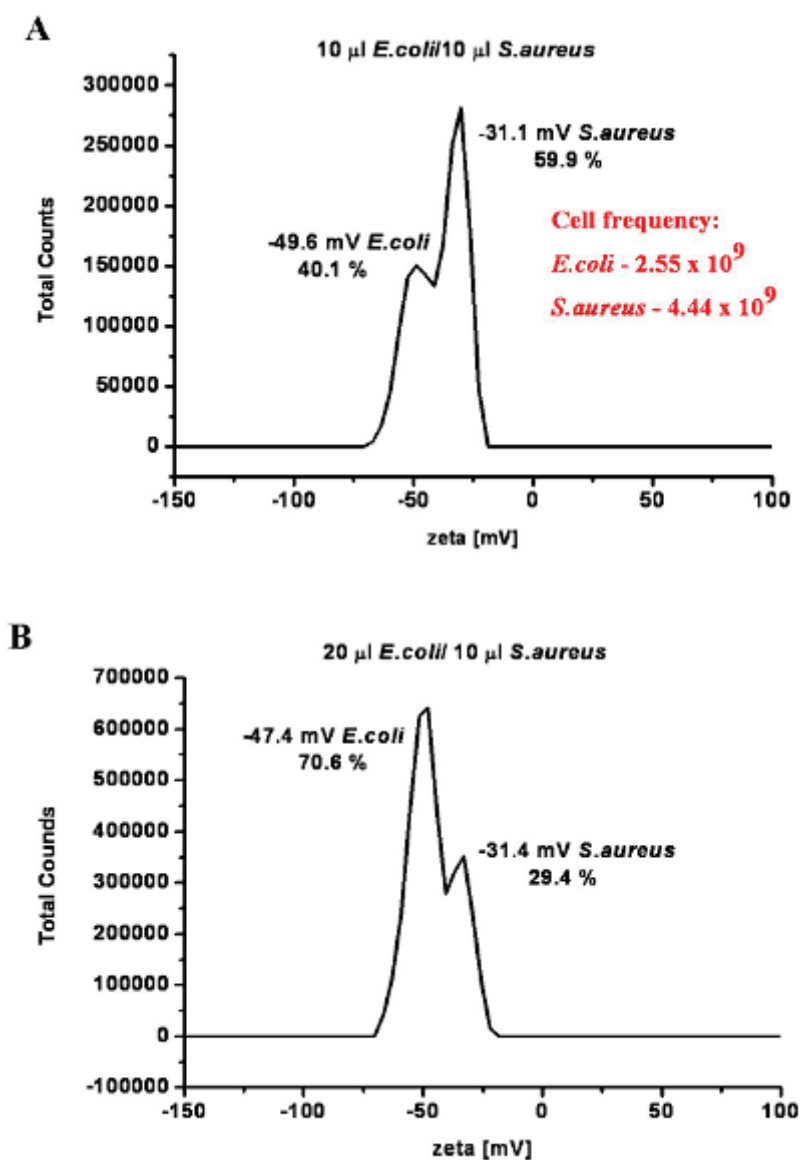
W kolejnym etapie badań wyznaczyłam potencjał zeta dla mieszaniny bakterii *E. coli* i *S. aureus* obecnych w zawiesinie w różnych stężeniach w celu poznania możliwości rozdzielenia bakterii (Rys. 8) [H6].



Rysunek 8. Rozkład potencjału zeta dla komórek *E. coli* (A) i *S. aureus* (B) [H6]

Rozkład potencjału zeta dla komórek *E. coli* jest jednolity, otrzymano sygnał w formie jednego pików o ściśle określonej wartości potencjału. W przypadku gronkowców sam rozkład potencjału zeta nie jest jednolity. Sumaryczna wartość wynosi $\xi = -38$ mV, lecz nie jest ona do końca wiarygodna. Na rysunku 8B można

zauważyć, iż migrujące strefy komórek posiadają różne wartości potencjału od $\xi = 5$ mV do $\xi = -50$ mV. Dlatego na elektroferogramach uzyskiwano każdorazowo wiele wąskich sygnałów pochodzących od tego gatunku bakterii. Zmiana stężenia komórek w zawieszynie pokazała, że możliwe jest rozróżnienie bakterii na podstawie wartości potencjału zeta, a jego zmiana powoduje zmianę w rozkładzie potencjału (Rys. 9) [H6].

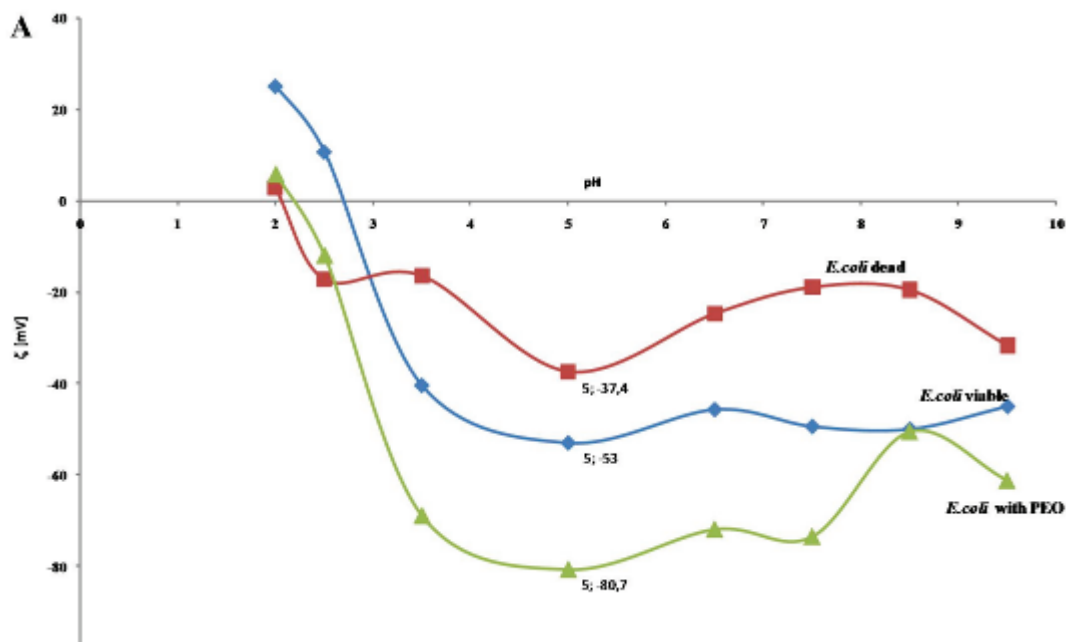


Rysunek 9. Rozkład potencjału zeta dla komórek *E. coli* i *S. aureus* przy różnych stężeniach komórek w zawieszynie [H6]

Wiedza dotycząca właściwości elektrycznych mikroorganizmów jest bardzo przydatna w tworzeniu biofilmów przez patogenne bakterie oraz aglomeraty o zdefiniowanej strukturze. Zmiana wartości potencjału zeta może również świadczyć o fizycznych zmianach zachodzących w komórce i może być użytecznym narzędziem diagnostycznym charakteryzującym cechy fenotypowe dla danego

gatunku bakterii. Jedną z takich zmian jest żywotność komórek bakteryjnych. Jak wiadomo, w momencie, gdy komórka obumiera błona komórkowa staje się przepuszczalna a potencjał membranowy obniża swoją wartość. Żywe komórki są większe i charakteryzują się wyższą bezwzględną wartością potencjału zeta. Zmiany w samej komórce bakteryjnej są zatem bezpośrednio związane ze zmianą wartości potencjału zeta dla poszczególnych mikroorganizmów, w tym żywych i martwych [H6]. Może to mieć kluczowe znaczenie w kontroli jakości produktów probiotycznych, gdyż pożyteczne mikroorganizmy aby przynosić korzyści dla naszego organizmu, muszą być żywe.

W celu weryfikacji żywotności komórek bakteryjnych oraz wykazania zmian w ładunku powierzchniowym dla komórek żywych i martwych oraz roztworów z dodatkiem PEO (Rys. 10) wyznaczyłam potencjał zeta dla tych trzech układów. Komórki *E.coli* i *S.aureus* zostały wcześniej zabite za pomocą 2-propanolu.



Rysunek 10. Pomiar potencjału zeta dla komórek żywych, martwych oraz w roztworze buforowym z dodatkiem PEO w funkcji wartości pH dla komórek *E. coli* [szczegóły w publikacji H6]

Przedstawiony przeze mnie cykl prac [H1-H6] poświęcony jest aspektom metodycznym wykorzystania elektroforezy kapilarnej do oznaczania mikroorganizmów. Chciałam zgłębić oraz poznać bliżej mechanizm rozdzielania komórek bakterii, a także udowodnić, w jaki sposób tworzą się klastry komórek bakteryjnych w polu elektrycznym. Było to możliwe po interpretacji danych uzyskanych z obserwacji mikroskopowej w połączeniu z pomiarami potencjału zeta oraz danymi uzyskanymi z elektroferogramów. Po zakończeniu tej części eksperymentów postanowiłam wykorzystać opracowane procedury do badań aplikacyjnych.

Kliniczna aplikacja szybkiego testu mikrobiologicznego opartego o kapilarną elektroforezę strefową do oceny infekcji ran pooperacyjnych [H7-H9]

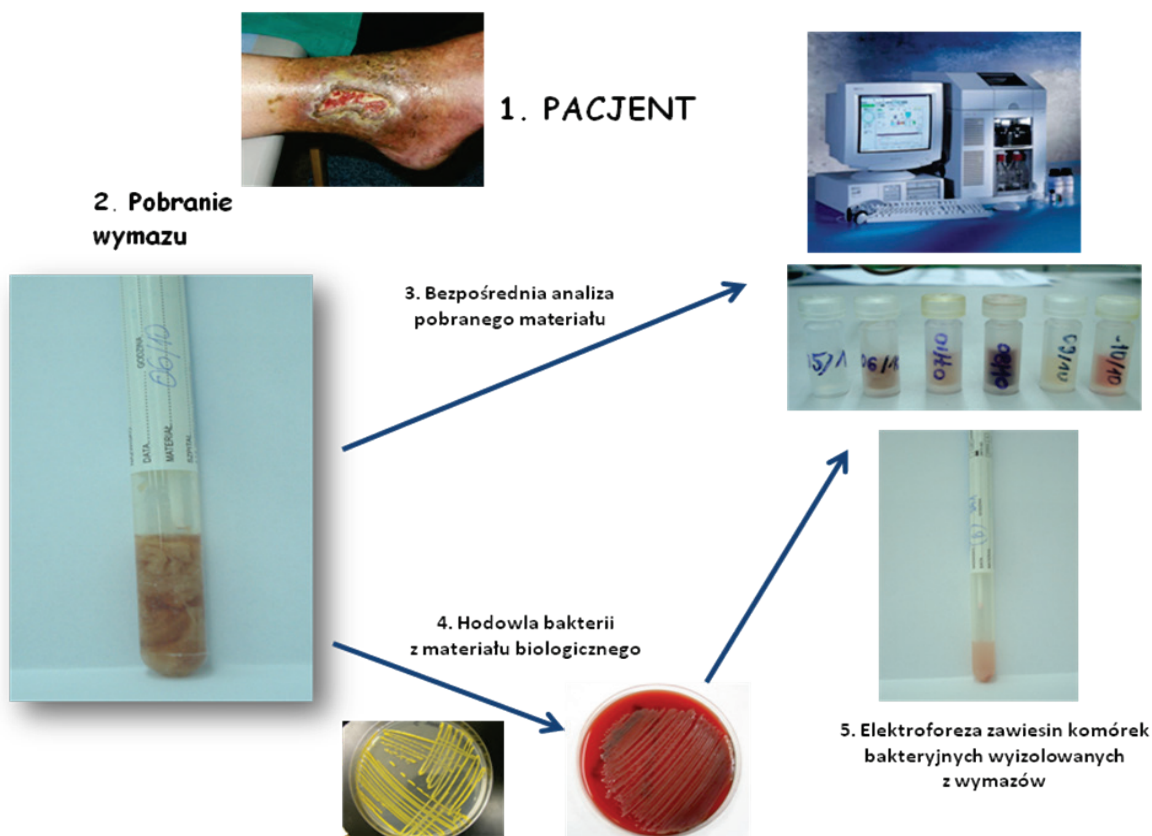
W ostatnich latach obserwuje się znaczny wzrost zainteresowania zakażeniami bakteryjnymi. Infekcje rozpatrywane są w dwóch kategoriach: jako choroby zakaźne rozwijające się u osób nie mających kontaktu ze środowiskiem szpitalnym **CAI** (z ang. *Community Acquired Infection*) oraz jako infekcje powstałe podczas pobytu pacjenta w szpitalu **HAI** (*Hospital Acquired Infection*), stwierdzone po 48 godzinach od przyjęcia lub wypisu ze szpitala. Wyróżnia się zakażenia egzogenne wywołane drobnoustrojami pochodzącymi ze środowiska zewnętrznego oraz endogenne, spowodowane florą bakteryjną pacjenta. Ze względu na lokalizację można je podzielić na zakażenia układowe (np. zakażenie układu moczowego, zakażenie układu oddechowego), zakażenia miejscowe (zakażenia skóry, błon śluzowych, powierzchniowe zakażenia miejsca operowanego) oraz zakażenia uogólnione (posocznica, wstrząs septyczny). Do tzw. „wrót zakażeń”, czyli miejsc, przez które drobnoustroje dostają się do organizmu, należą układ pokarmowy, oddechowy, wydalniczo-płciowy oraz otwarte rany, w tym **rany pooperacyjne**. W przypadku rany pooperacyjnej za zakażenie uznaje się infekcję, która wystąpiła miesiąc po operacji. Rany chirurgiczne klasyfikujemy na rany czyste, czyste - zanieczyszczone, zanieczyszczone i skażone w zależności od miejsca przeprowadzania zabiegu. Narażenie na infekcję związane jest z stanem pacjenta, jego wiekiem, stanem odżywiania (nadwaga, niedożywienie), chorobami (choroba zakrzepowa żył, cukrzyca), leczeniem (chemioterapia, kortkosterapia).

Wczesne wykrycie patogenu, wywołującego chorobę infekcyjną o istotnej klinicznie manifestacji i w miejscu nietypowym, może w niektórych przypadkach być warunkiem koniecznym do wdrożenia właściwej, celowanej antybiotykoterapii umożliwiającej skuteczne wyleczenie. Dotychczasowe możliwości diagnostyczne niestety nie spełniają podstawowego warunku skuteczności terapii, jakim jest czas uzyskania wyniku mikrobiologicznego. Metody posiewowe, fenotypowe wymagają bowiem nawet kilku dni hodowli, bardzo czułe zaś metody oparte o identyfikację genetyczną (PCR) dostępne są wyłącznie w nielicznych ośrodkach, są bardzo drogie i wymagają specjalistycznej aparatury. Dlatego z punktu widzenia szybkiej diagnostyki zakażeń ran pooperacyjnych bardzo użyteczna może być elektroforetyczna ocena jakościowej zawartości pobranych wymazów. Sama informacja dotycząca obecności patogenu w ranie pooperacyjnej może w znaczący sposób ułatwić dalsze postępowanie diagnostyczne [H7].

W celu opracowania elektroforetycznej metody identyfikacji patogenów do badania wybrano kolejnych 80 pacjentów, u których rozpoznano infekcję rany pooperacyjnej na podstawie standardowych objawów klinicznych. W momencie pobierania materiału nie znano jeszcze czynnika etiologicznego infekcji. Próbkę biologiczną były każdorazowo przygotowywane w warunkach aseptycznych sali zabiegowo-opatrunkowej Kliniki Chirurgii Ogólnej, Gastroenterologicznej i Onkologicznej CM UMK w Toruniu. Równolegle pobierano klasyczny wymaz z rany, przy pomocy szpatałki mikrobiologicznej, którą jako

materiał kontrolny przekazywano w sposób zgodny z obowiązującymi w klinice standardami do Zakładu Mikrobiologii Szpitala Wojewódzkiego w Toruniu w celu przeprowadzenia analiz weryfikujących (klasyczne metody diagnostyki bakteriologicznej).

Próbka była natychmiast przewożona do laboratorium analitycznego w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky UMK w Toruniu gdzie w ciągu 30 minut zostawała bezpośrednio wprowadzana do eksperymentalnego układu diagnostycznego opartego o elektroforezę kapilarną. Otrzymany wynik w postaci elektroferogramu był zestawiany z uzyskanym kilka dni później fenotypowym wynikiem wzorcowym. W kolejnym etapie badania, z posiadanego podłoża bakteriologicznego na płytce Petri'ego, na którym wyhodowano kolonie badanych bakterii, wprowadzano je do układu CZE. Uzyskiwano w ten sposób elektroferogram, który uznawano za wzorcowy dla mikroorganizmów wyhodowanych z pierwotnej próbki biologicznej. Algorytm postępowania diagnostycznego przedstawiono na poniższym schemacie (Rys. 11).



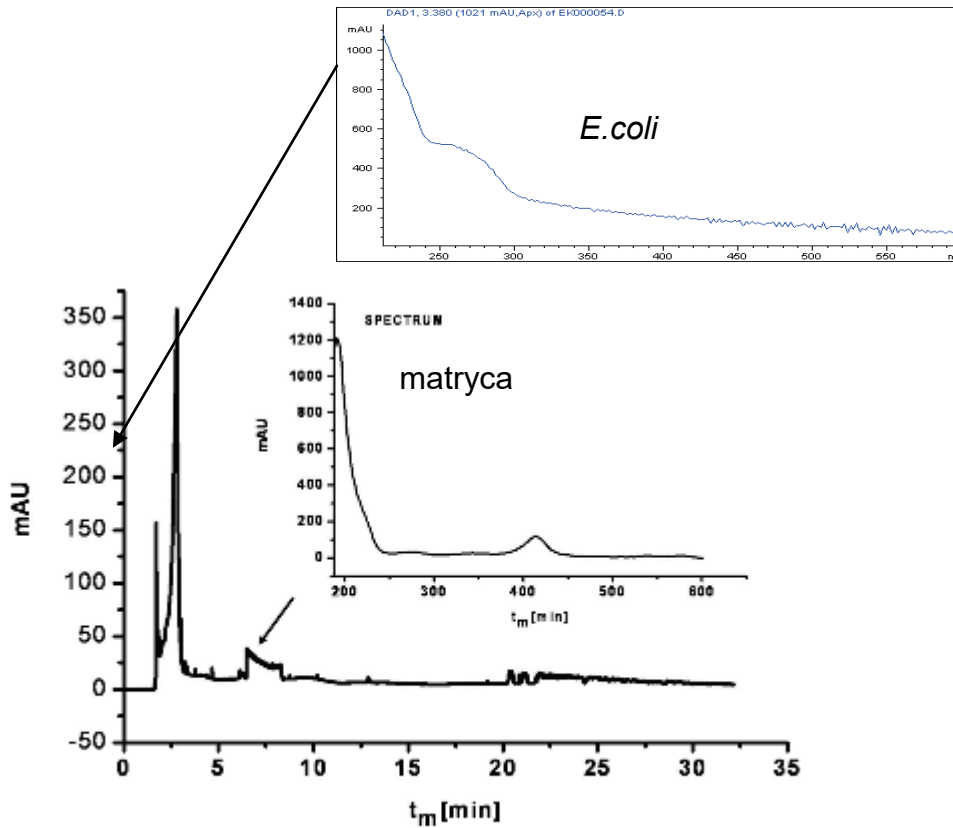
Rysunek 11. Algorytm wykonywania badań identyfikacyjnych (szczegóły publikacja [H7, 25])

Opierając się na algorytmie postępowania przedstawionym na Rys.11 każdorazowo po pobraniu materiału biologicznego z rany pooperacyjnej wykonywano analizy elektroforetyczne. Na poniższym rysunku przedstawiono ranę pooperacyjną, z której pobierany był wymaz (Rys.12).



Rysunek 12. Zdjęcie przykładowej rany pooperacyjnej, z której pobierano wymaz do analiz elektroforetycznych

Po przeprowadzeniu kilkuset eksperymentów wykazałam, iż po odpowiednim doborze warunków prowadzenia analiz elektroforetycznych możliwa jest szybka ocena obecności komórek bakteryjnych w wymazach pobranych od pacjentów po różnego typu zabiegach chirurgicznych (głównie resekcja jelita grubego przy chorobach nowotworowych). W celu potwierdzenia wiarygodności uzyskanych wyników elektroforetycznych każdorazowo w warunkach szpitalnych wykonywano posiew z tej samej próbki wymazu, wyhodowane komórki natomiast poddawałam ponownej analizie elektroforetycznej i dokonywałam porównania widm UV-Vis charakterystycznych dla bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych i matrycy. Na poniższym rysunku przedstawiono typowy elektroferogram, jaki można było uzyskać dla badanego materiału biologicznego oraz wynik badania mikrobiologicznego potwierdzający obecność bakterii w wymazie (Rys.13,14) . Należy tutaj zaznaczyć, iż **w przypadku elektroforezy wynik dotyczący samej obecności patogenu w próbce był znany po 10 minutach**, natomiast potwierdzenie mikrobiologiczne polegające na hodowli komórek bakteryjnych trwało kilka dni [H7].

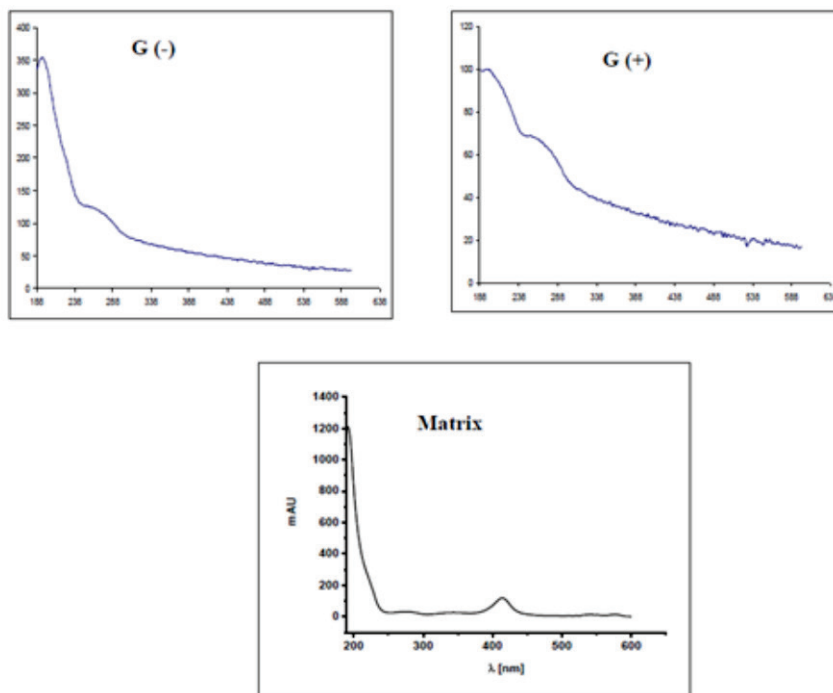


Rysunek 13. Przykładowy elektroferogram otrzymany dla próbki wymazu z rany pooperacyjnej wraz z charakterystycznymi widmami UV-Vis [25]

Posiew izolacyjny wymazów	
Materiał: Wymaz z rany, przyjęty: 10:22	
Materiał diagnostyczny:	Wymaz z rany
Data zakończenia badania:	26-01-2011
Wynik badania:	dodatni
Identyfikacja	
A1 f	Identyfikacja
	Komentarz
	Escherichia coli
	+
Antybiotykooporność	
Nazwa antybiotyku	1 Escherichia coli
Ampicylina	R - >=32
Ampicylina - sulbaktam	R - >=32
Piperacylina	R - >=128
Piperacylina/tazobaktam	S - <=4
Cefuroksym	S - 4
Cefotaksym	S - <=1
Ceftazidim	S - <=1
Gentamycyna	S - <=1
Ciprofloksacyna	S - <=0,25
Tetracyklina	R - >=16
Trimetoprim/sulfametoksazol	S - <=20
R - oporny, S - wrażliwy, I - średniowrażliwy	

Rysunek 14. Posiew izolacyjny wymazów potwierdzający obecność bakterii *E. coli*

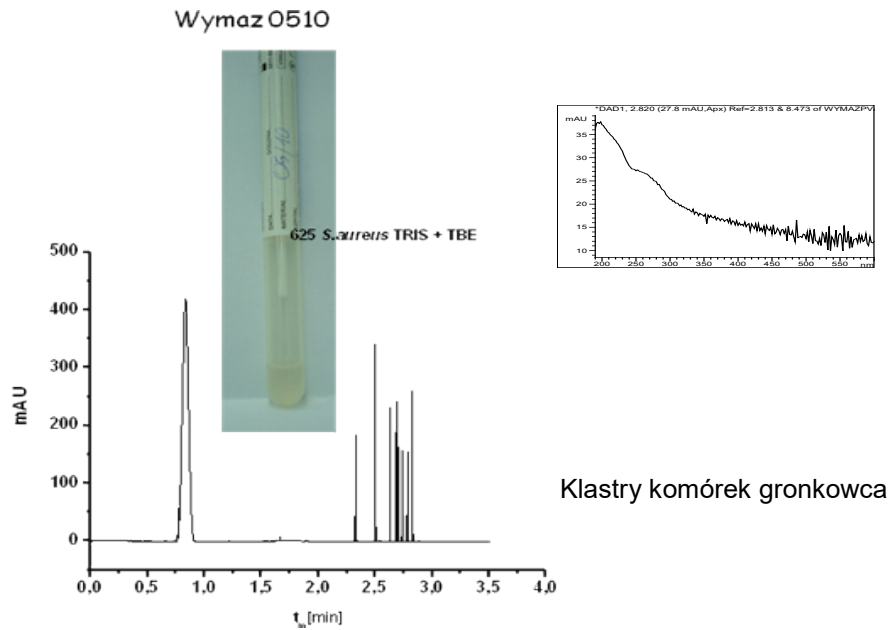
Głównym problemem, na jaki napotkano podczas prowadzenia badań była złożoność otrzymanego materiału biologicznego. Wymazy charakteryzowały się bowiem bardzo złożoną matrycą, w skład której wchodziła krew, elementy morfotyczne krwi, fragmenty tkanek, ropa i żółć. To w znaczny sposób utrudniało interpretację otrzymywanych wyników, aczkolwiek po przeprowadzeniu setek analiz można było otrzymać charakterystyczne widma z zakresu UV-Vis ($\lambda = 214 \text{ nm}$) identyfikujące bakterie w obrębie gatunku Gram-dodatnich, Gram-ujemnych oraz matrycy (Rys. 15) [H7].



Rysunek 15. Przykładowe widma pochodzące od bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych i matrycy [25]

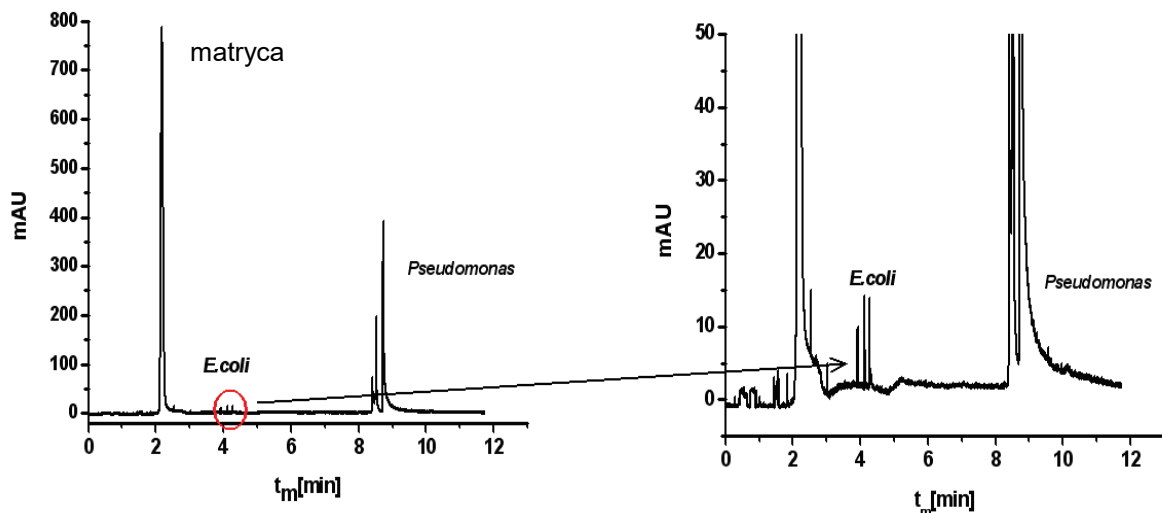
Satysfakcjonujące wyniki uzyskałam również w przypadku identyfikacji bakterii Gram-dodatniej, jaką jest *S.aureus* (Rys.16). Próby wstępnej identyfikacji komórek bakteryjnych w wymazie dokonano na podstawie charakterystycznego układu sygnałów na elektroferogramie, na którym komórki bakteryjne eluowane były w postaci klastrów dając wiele sygnałów o niskiej intensywności. Migracja komórek bakterii Gram-dodatniej w klastrach jest naturalnym zachowaniem tych komórek w polu elektrycznym, co zostało wcześniej potwierdzone przez badania mikroskopowe (połączenie elektroforezy ze stereoskopowym mikroskopem fluorescencyjnym) oraz pomiarami potencjału zeta [H6, 26]. Jak widać nawet w tak skomplikowanych układach jak próbki biologiczne mechanizm migracji związany w budową poszczególnych gatunków bakterii jest taki sam. W zależności od składu matrycy (zawartość, krwi, ropy, elementów morfotycznych) czasy migracji nie mogły posłużyć do oznaczenia poszczególnych szczepów, natomiast doskonałym narzędziem okazały się widma UV-Vis, które w jednoznaczny sposób zapewniały

możliwość natychmiastowego stwierdzenia, czy w badanym materiale występują komórki bakteryjne.



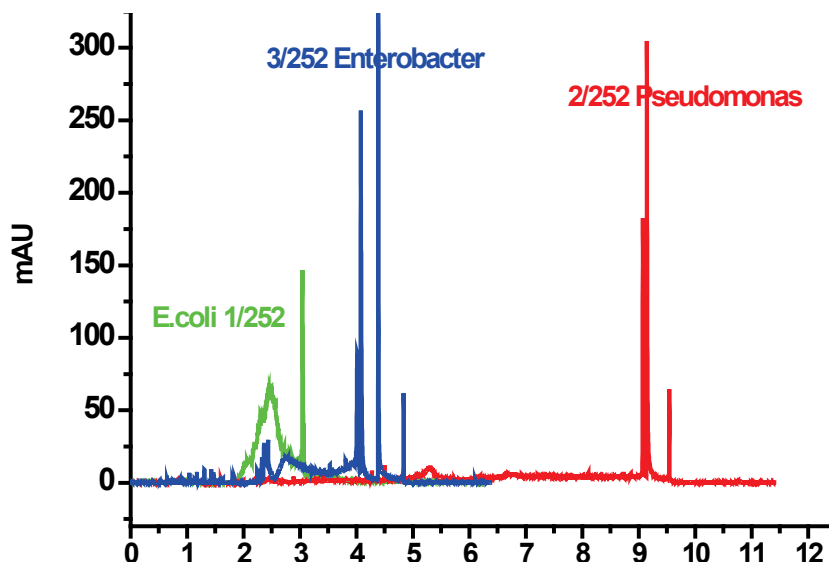
Rysunek 16. Elektroferogram otrzymany dla próbki wymazu, w której obecne były bakterie *S. aureus*. Można zaobserwować charakterystyczne dla tej bakterii skupiska komórek bakteryjnych - kilka wąskich pików

Podczas prowadzenia eksperymentów najczęściej badany materiał biologiczny był zainfekowany więcej niż jedną bakterią (Rys. 17). Istotna była więc możliwość elektroforetycznego rozdzielania różnych gatunków bakterii. W przypadku różnych gatunków bakterii nie stanowiło to większego problemu, nie było to jednak możliwe w przypadku dwóch podobnych morfologicznie bakterii z jednego gatunku. Celem zaproponowanego tutaj testu nie była jednak identyfikacja poszczególnych szczepów komórek bakteryjnych a szybka ocena jakościowa, czy komórki bakteryjne są obecne w badanej próbce.



Rysunek 17. *E. coli* i *P. aureginosa* hodowane na jednej płytce (niepublikowane wyniki)

Zdarzało się, iż w badanym materiale obecne były trzy różne bakterie, co udało się elektroforetycznie udowodnić. W celu weryfikacji każdorazowo porównywałam wynik z wzorcami uzyskanymi po hodowli w warunkach szpitalnych (Rys.18).

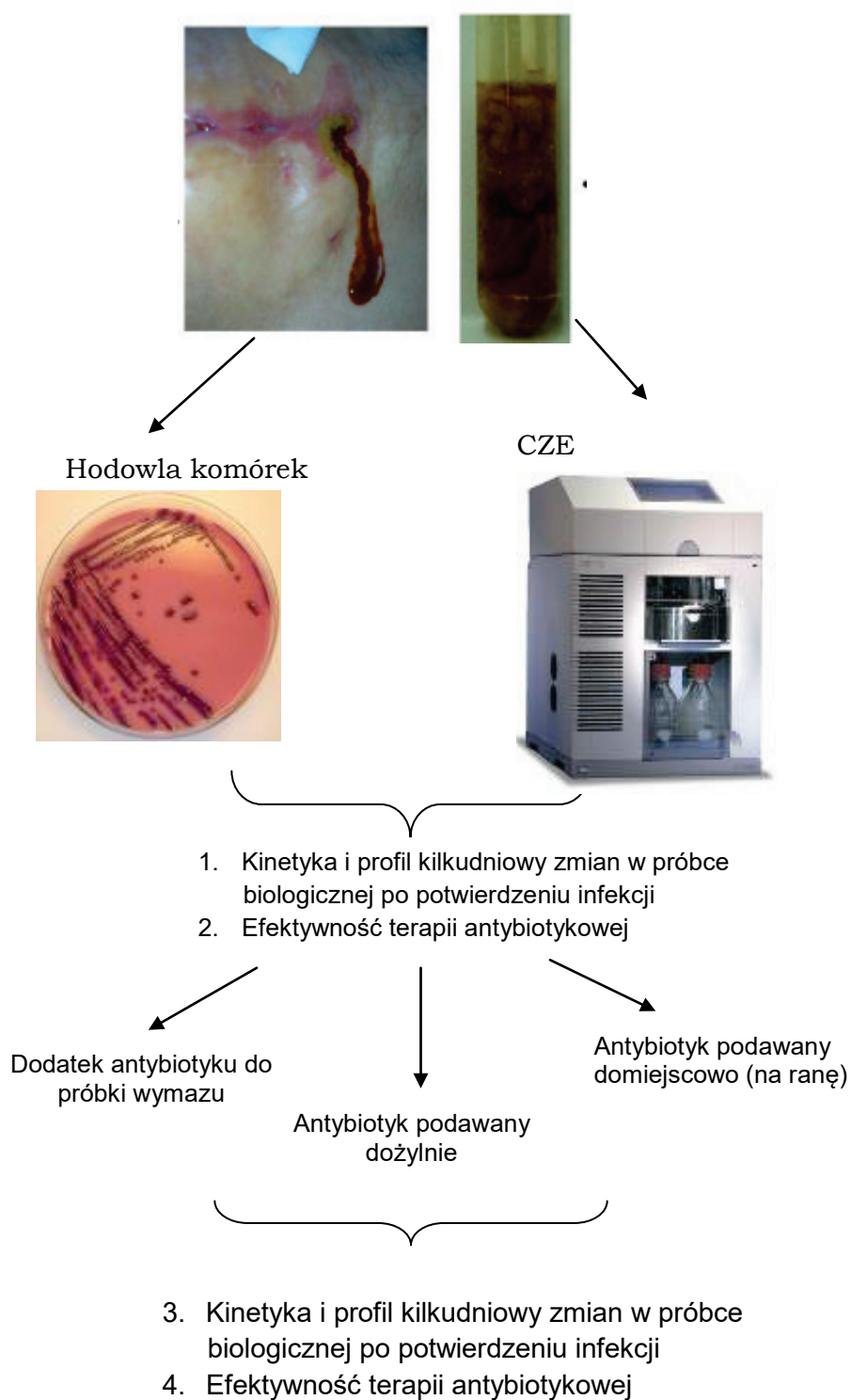


Rysunek 18. Elektroferogram otrzymany dla wymazu, w którym obecne były trzy różne bakterie

Pacjenci, u których wykryto obecność infekcji rany pooperacyjnej (infekcja miejsca operowanego) byli poddawani terapii antybiotykowej przy użyciu Cipronexu i gentamycyny. Za pomocą analizy elektroforetycznej podjęłam próbę oszacowania ilościowego zawartości komórek bakteryjnych w próbce wymazu w ciągu kilku dni prowadzenia terapii. W tym celu, każdego dnia analizowałam próbkę wymazu pochodzącą od tego samego pacjenta szacując zmiany jakie zachodzą podczas leczenia infekcji. Dzięki temu sporządziłam kilkudniowe profile zmian zachodzących w materiale biologicznym. Łącznie w ten sposób zdiagnozowałam 50 osób [H8].

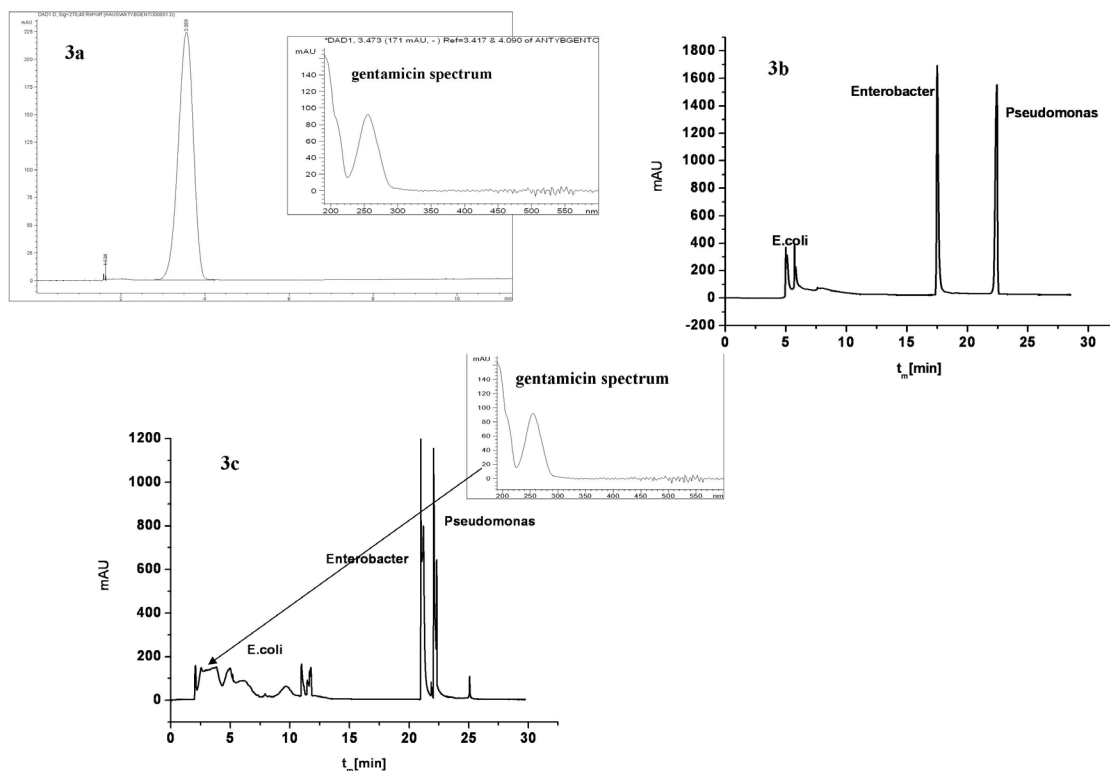
Biorąc pod uwagę otrzymane wyniki można stwierdzić, że antybiotyk ma istotny wpływ na komórki bakteryjne, co widoczne jest na elektroferogramach. Przykładowo, wymaz oznaczony, jako 03/10 pobrany był od pacjenta, którego poddano terapii antybiotykowej, podawano mu dożylnie Cipronex. Na elektroferogramie (Rys. 19) widoczne są sygnały pochodzące od dwóch zidentyfikowanych gatunków bakterii: *E. coli* oraz *E. faecium*. Sygnały pochodzące od *E. coli* są poszerzone, ogonujące, natomiast sygnały *E. faecium* wysokie i intensywne. Można więc wywnioskować, że komórki *E. coli* są mniej odporne na lityczne działanie antybiotyku niż *E. faecium*. Jest to zgodne z danymi z literatury. Wynika to najprawdopodobniej z różnic w budowie morfologicznej dwóch gatunków bakterii: *E. coli* to pałeczki Gram-ujemne, natomiast *E. faecium* to ziarniaki Gram-dodatnie.

Podczas prowadzenia eksperymentów związanych z wpływem antybiotyków na komórki bakteryjne (oszacowanie działania terapii) stwierdzono, iż duże znaczenie ma sposób podania leku (dożylnie, domięsowo). W tym celu zaproponowano trzy rozwiązania (Rys.19).



Rysunek 19. Schemat postępowania analitycznego przy identyfikacji zakażeń ran pooperacyjnych

W pierwszym etapie prowadzenia badań wykonałam analizę elektroforetyczną samego antybiotyku (gentamycyny) w celu uzyskania charakterystycznego widma, za pomocą którego będzie można na elektroferogramie wskazać sygnał pochodzący od samego leku. Kolejnym etapem była analiza próbki wymazu przed rozpoczęciem antybiotykoterapii. Wreszcie analizie były poddawane próbki wymazu od pacjenta, który rozpoczął terapię antybiotykową (Rys. 20).



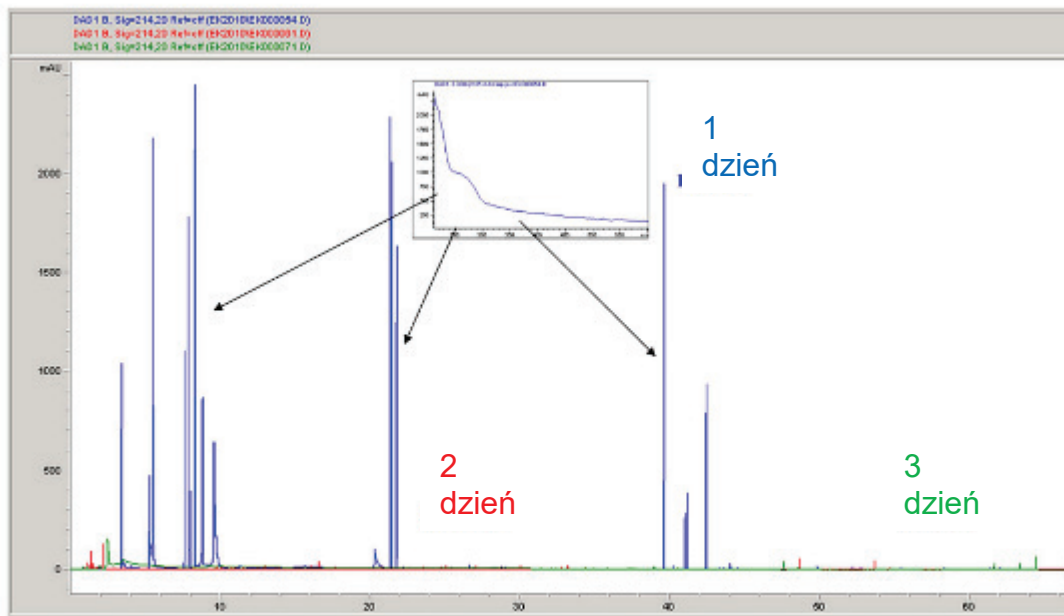
Rysunek 20. Elektroferogramy i widma uzyskane dla wzorca gentamycyny (a), próbki wymazu przed podaniem antybiotyku (b) oraz próbki po rozpoczęciu terapii antybiotykowej [H8]

Jak można zaobserwować na Rys. 20 w próbce wymazu przed rozpoczęciem terapii nie ma sygnału pochodzącego od samego antybiotyku. W próbce wymazu po podaniu pacjentowi leku pojawia się sygnał w czasie martwym pochodzący od antybiotyku. Poprzez porównanie widm na obu elektroferogramach można w łatwy sposób kontrolować obecność leku w próbce biologicznej. Ważniejszą obserwacją jest natomiast fakt, iż w próbce po podaniu antybiotyku pasmo pochodzące od komórek *E.coli* staje się rozmyte i szerokie. To świadczy o tym, iż gentamycyna oddziałuje z komórkami bakteryjnymi. Wynik ten osiągnięto poprzez dodatek leku bezpośrednio do próbki wymazu, działanie antybiotyku na komórki bakteryjne w tej sytuacji było porównywalne do sytuacji, w której lek w postaci maści był naniesiony bezpośrednio na ranę. Dużym ułatwieniem był fakt, iż gentamycyna w zastosowanych warunkach analizy migrowała wraz z czołem przepływu elektroosmotycznego i była widoczna jako pierwszy sygnał na elektroferogramie.

W tym przypadku możemy również postulować mechanizm działania tego leku na komórki *E.coli*, który najprawdopodobniej polegał na zmianie przepuszczalności błon komórkowych i powolną lizę komórek *E. coli*.

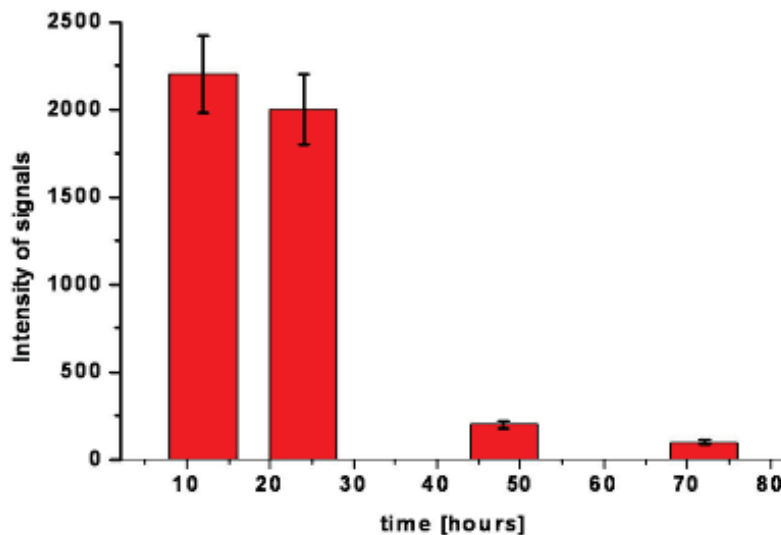
W kolejnym eksperymencie dokonałam kilkudniowej oceny efektywności działania terapii antybiotykowej. W tym celu przez trzy kolejne dni pobierano próbkę od pacjenta, któremu lek podawany był dożylnie, w kroplówce [H9]. Każdorazowo wykonywano w warunkach szpitalnych posiew z badanych wymazów w celu weryfikacji mikrobiologicznej i uzyskano zgodność z otrzymanymi przeze mnie za pomocą elektroforezy wynikami.

Kolejnym bardzo istotnym krokiem było stworzenie dla każdego z pacjentów profilu pokazującego ilościowo spadek liczebności komórek bakteryjnych podczas prowadzenia terapii antybiotykowej (Rys. 21) [H9]. W przypadku bakterii *E. coli*, która najczęściej występuje po zabiegu resekcji jelita grubego, można stanowczo stwierdzić, iż już drugiego dnia można było zaobserwować spadek liczebności bakterii, natomiast w trzeciej dobie po przeprowadzonej operacji obecność bakterii była już niewielka. Po pięciu dniach nie zaobserwowano na elektroferogramie sygnałów pochodzących od komórek bakteryjnych.



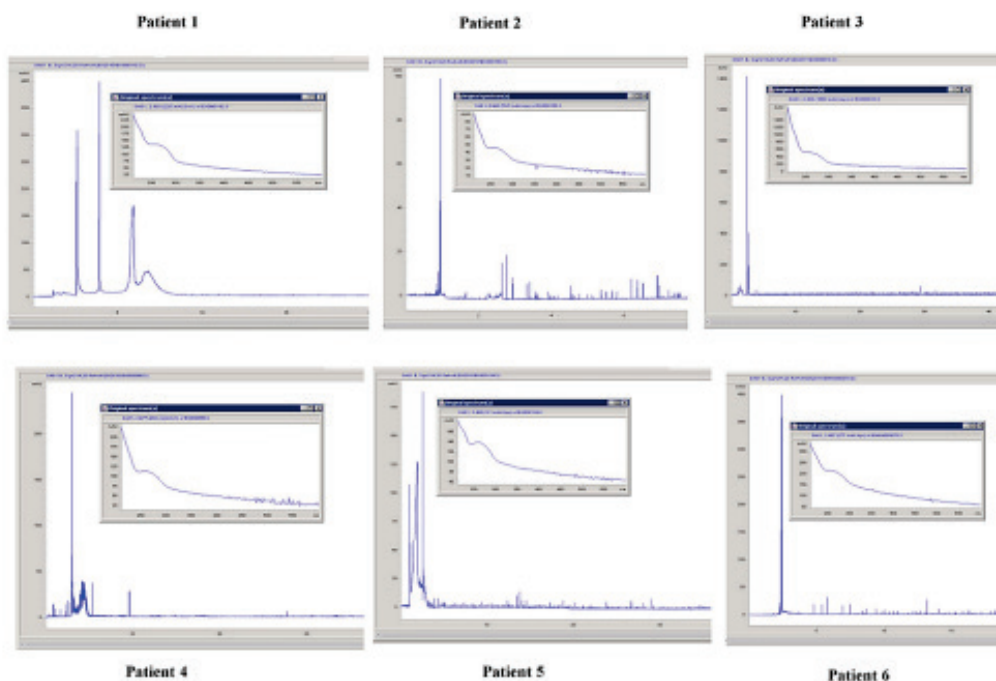
Rysunek 21. Trzydniowy profil dla próbki biologicznej podczas prowadzenia terapii [H9]

Procentowo można oszacować, iż po 24 godzinach terapii spadek ilościowy dla komórek bakteryjnych wynosi średnio 9%, po 48 godzinach 90 %, po 72 godzinach 95%. Procent ten wyliczany był w oparciu o pole powierzchni pików zidentyfikowanych jako sygnały pochodzące od komórek bakteryjnych (Rys. 22) [H9].



Rysunek 22. Spadek liczebności komórek bakteryjnych w próbce wymazów podczas terapii antybiotykowej [H9]

Ostatnim etapem prowadzonych badań była weryfikacja w obrębie większej liczby pacjentów, i tak na poniższym rysunku przedstawiono elektroferogramy otrzymane dla sześciu różnych pacjentów ze zdiagnozowaną infekcją miejsca operowanego. Patogenem w tym przypadku była bakteria *E. coli* (Rys.23) [H9]. W łatwy sposób można zauważyć, iż widma otrzymane we wszystkich przypadkach umożliwiają szybkie rozpoznanie obecności bakterii G(-) w próbce biologicznej, bez jakiegokolwiek jej przygotowania [H9].



Rysunek 23. Elektroferogram otrzymany dla próbek od sześciu różnych pacjentów ze stwierdzoną infekcją miejsca operowanego [H9]

Należy tutaj zaznaczyć, iż za każdym razem analizy elektroforetyczne były potwierdzane standardowymi metodami mikrobiologicznymi. Nie można tutaj mówić o analizie ilościowej komórek bakteryjnych, można natomiast wykazać, iż elektroforeza kapilarna stanowi doskonale narzędzie analityczne i może służyć jako szybki test przesiewowy w diagnostyce medycznej [H9].

Po wykonaniu pierwszych klinicznych aplikacji wydaje się, że wszystkie założone cechy dobrego testu przesiewowego zostały w elektroforetycznej metodzie analizy mikroorganizmów osiągnięte [H7-H9].

Na obecnym etapie badań cechuje ją bezsprzecznie:

- ✓ **Prostota.** Zastosowana aparatura umożliwia umieszczenie jej w dowolnym pomieszczeniu. Wymaga jedynie podstawowej obsługi. Analiza nie wymaga przygotowania próbki, pozwalając na jej bezpośrednie wprowadzenie do aparatury pomiarowej natychmiast po pobraniu z badanego miejsca.
- ✓ **Szybkość.** Czas uzyskania badania identyfikującego obecność komórek bakterii w ustalonych warunkach nie przekracza 60 minut. W porównaniu do tradycyjnych metod identyfikujących ten gatunek bakterii jest to wynik rewolucyjny, zrównujący czas jego uzyskania do rutynowych, podstawowych analiz krwi.
- ✓ **Czułość i powtarzalność.** Na podstawie przeanalizowanej grupy pacjentów z infekcjami ran pooperacyjnych uzyskano czułość 86,7% także w przypadku mieszanin bakterii różnych gatunków. Specyficzność metody wyliczono na poziomie 85%. Przy zachowaniu stabilnych parametrów badania jest to

metoda absolutnie powtarzalna. Co więcej, w kilku przypadkach wykryła ona obecność kolonii innych gatunków bakteryjnych, wyprzedzając tym samym czułość rutynowych metod kulturowych (fenotypowych).

Do uzyskania wyników opublikowanych w publikacjach [H7-H9] przyczynił się przyznany w 2011 roku grant Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego, Nr 3694/B/H03/2011/40, pt.: "Ocena przydatności klinicznej elektroforezy kapilarnej i spektrometrii mas do diagnostyki i monitorowania terapii zakażeń bakteryjnych", którego byłam kierownikiem i głównym wykonawcą. W roku 2008 brałam udział w kursie zakończonym certyfikatem prowadzonym przez firmę "ALAB" dotyczącym „Zastosowania technik elektroforetycznych oraz fluorescencyjnych (rozdzielanie białek w systemie NuPAGE, nowej generacji znaczniki fluorescencyjne QDots)”. W czerwcu 2010 roku wzięłam udział w szkoleniu z zakresu: „Analiza krzywych topnienia o wysokiej rozdzielczości (HRM) w ilościowym PCR”, Bio-Rad’ Genomics Roadshow w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Kolejnym etapem podnoszenia moich kwalifikacji zawodowych był kurs „Elektroforeza kapilarna w analizie farmaceutycznej” organizowany przez Ośrodek Szkolenia Podyplomowego Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. W tym samym roku odbyłam również szkolenie z zakresu elektroforezy żelowej w Zakładzie Neurochemii, Pracowni Farmakoneurochemii Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej w Warszawie.

Przeprowadzone badania oraz rezultaty uzyskane w prezentowanym cyklu publikacji [H1-H9] pozwalają na następujące podsumowanie mojego osiągnięcia:

- 1) Dzięki modyfikacji chemicznej kwarcowych mikrokolumn za pomocą różnych monomerów (akrylamidu, trimetylochlorosilanu, diwinylobenzenu, czy mieszaniny styrenu i diwinylobenzenu) dokonałam separacji i identyfikację różnych gatunków komórek bakteryjnych wraz ze zminimalizowaniem niekorzystnych zjawisk takich jak silna adhezja, czy tworzenie klastrów przez komórki bakteryjne [H1,H2];
- 2) W ramach weryfikacji wiarygodności otrzymanych danych elektroforetycznych dokonałam analizy PCR dla wybranych klinicznych szczepów *S. aureus* i *H. pylori*. Uzyskałam 100 % zgodność z genomowymi szczepami wzorcowymi z bazy danych GenBank [H3,H5];
- 3) Poprzez pomiar potencjału zeta wyjaśniłam zjawisko tworzenia aglomeratów przez komórki bakteryjne. Ilość aglomeratów widoczna pod stereoskopowym mikroskopem fluorescencyjnym obserwowana podczas analizy elektroforetycznej była zgodna z ilością sygnałów obecnych na elektroferogramach [H6];
- 4) Za pomocą pomiarów potencjału zeta wykryłam różnice w ładunku powierzchniowym komórek żywych, martwych oraz w roztworze z dodatkiem PEO jak również uzyskałam rozdzielanie dwóch gatunków bakterii [H6];

- 5) Dokonałam oznaczenia bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych w próbkach wymazów ran pooperacyjnych i stworzyłam tygodniowe profile ilościowej zawartości komórek bakteryjnych w badanym materiale – **pierwsza na świecie kliniczna aplikacja elektroforezy kapilarnej bezpośrednio na próbkach pobranych od pacjentów [H7-H9]**;
- 6) Zbadałam efektywność terapii antybiotykowej poprzez monitoring pacjentów kilka dni po przeprowadzonej operacji chirurgicznej. Zaproponowana elektroforetyczna metoda oceny infekcji ran pooperacyjnych charakteryzuje się prostotą, szybkością oraz wysoką czułością **[H7-H9]**;
- 7) Wszystkie założone cechy dobrego testu przesiewowego zostały w elektroforetycznej metodzie analizy mikroorganizmów osiągnięte **[H7-H9]**.

Literatura

1. B. Buszewski, M. Szumski, **E. Kłodzińska** & H. Dahm: *Separation of Bacteria by capillary electrophoresis*, J. Sep. Sci. (JSS) 11 (2003) 1045.
2. M. Szumski, **E. Kłodzińska**, B. Buszewski: *Separation of microorganisms using electromigration techniques*, J. Chromatogr. A, 1084 (2005) 186.
3. **E. Kłodzińska**, H. Dahm, M. Jackowski, B. Buszewski: *Practical electromigration techniques to separate microorganisms in medical analysis*, LC-GC Eur. 18(9) (2005) 472.
4. **E. Kłodzińska**, D. Moravcova, P. Jandera, B. Buszewski, *Monolithic continuous beds as a new generation of stationary phase for chromatographic and electro-driven separations*, J. Chromatogr. A, 1109 (2006) 51.
5. **E. Kłodzińska**, H. Dahm, H. Różycki, J. Szeliga, M. Jackowski, B. Buszewski, *Rapid identification of Escherichia coli and Helicobacter pylori in biological samples by capillary zone electrophoresis*, J. Sep. Sci., 29 (2006) 1180.
6. **E. Kłodzińska**, B. Buszewski, H. Dahm, H. Różycki, J. Szeliga, M. Jackowski: *Capillary electrophoresis as a new method for rapid identification of Helicobacter pylori*, Biomedical Chromatography, 27 (2) (2007) 116.
7. M. Szumski, **E. Kłodzińska**, R. Jarmalaviciene, A. Maruska, B. Buszewski: *Considerations on influence of charge distribution on determination of biomolecules and microorganisms and tailoring the monolithic (continuous bed) materials for bioseparations*, J. Biochem. Biophys. Methods, 70 (2007) 107.
8. [H1]. J. Szeliga, M. Jackowski, **E. Kłodzińska**, H. Dahm, B. Buszewski: *Application of capillary zone electrophoresis (CZE) to the determination of pathogenic bacteria for medical diagnosis*, Analytical Bioanalytical Chemistry, 391 (2008) 2153.
9. S. Hjerten, K. Elenbring, F. Kilar, J.L. Liao, A.J.C. Chen, C.J.Seibert, M.D. Zhu: *Carrier-free zone electrophoresis, displacement electrophoresis and isoelectric focusing in a high-performance electrophoresis apparatus*, J. Chromatogr. 403 (1987) 47.
10. R.C. Ebersole, R.M. McCormick: *Separation and isolation of viable bacteria by capillary zone electrophoresis*, Bio/Technology 11 (1993)1278.
11. M. Torimura, S. Ito, K. Kano, T. Ikeda, Y. Esaka, T. Ueda: *Surface characterization and on-line activity measurements of microorganisms by capillary zone electrophoresis*, J. Chromatogr. B 721 (1999) 31.
12. A. Pfetsch, T. Welsch: *Determination of the electrophoretic mobility of bacteria and their separation by capillary zone electrophoresis*, Fresenius J. Anal. Chem. 359 (1997) 198.
13. J.R. Glynn, B.M. Belongia, R.G. Arnold, K.L. Ogden, and J.C. Baygents: *Capillary Electrophoresis Measurements of Electrophoretic Mobility for Colloidal Particles of Biological Interest*, Appl. Environ. Microbiol. 64 (1998) 2572.

14. D.W. Armstrong, G. Schulte, J.M. Schneiderheinze, and D.J. Westenberg: *High efficiency separation of microbial aggregates using capillary electrophoresis*, Anal. Chem. 71 (1999) 5465.
15. D.W. Armstrong, M. Girod, L. He, M.A. Rodriguez, W. Wei, J. Zheng, E.S. Yeung: Article, *Mechanistic Aspects in the Generation of Apparent Ultrahigh Efficiencies for Colloidal (Microbial) Electrokinetic Separations*, Anal. Chem. 74 (2002) 5523.
16. J. Zheng, E.S. Yeung: *Mechanism of Microbial Aggregation during Capillary Electrophoresis*, Anal. Chem. 75 (2003) 818.
17. [H2] B. Buszewski, **E. Kłodzińska**: *Determination of pathogenic bacteria by capillary electrophoresis with surface-modified capillaries*, Electrophoresis, 29, (2008), 4177.
18. [H3] K. Hryniewicz, **E. Kłodzińska**, H. Dahm, B. Buszewski, J.Szeliga, M. Jackowski: *Combination of PCR assays and electromigration techniques in differentiation of clinical strains of Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol. Lett. 286 (2008) 1.
19. [H4] **E. Kłodzińska**, B. Buszewski: *Electrokinetic detection and characterization of intact microorganisms*, Anal. Chem., 81 (2009) 8.
20. [H5] **E. Kłodzińska**, M. Szumski, K. Hryniewicz, E. Dziubakiewicz, M. Jackowski, B. Buszewski: *Differentiation of Staphylococcus aureus strains by CE, zeta potential and coagulase gene polymorphism*, Electrophoresis, 30 (2009) 3086.
21. [H6] **E. Kłodzińska**, M. Szumski, E. Dziubakiewicz, K. Hryniewicz, E. Skwarek, W. Janusz, B. Buszewski: *Effect of zeta potential value on bacterial behavior during electrophoretic separation*, Electrophoresis, 31 (2010) 1590.
22. [H7] J. Szeliga, **E. Kłodzińska**, M. Jackowski, B. Buszewski: *The clinical use of a fast screening test based on technology of capillary zone electrophoresis (CZE) for identification of Escherichia coli infection in biological material*, Medical Science Monitor 17 (10) (2011) MT91-MT96.
23. [H8] **E. Kłodzińska**, M. Jaworski, W. Kupczyk, M. Jackowski, B. Buszewski: *A study of interactions between bacteria and antibiotics by capillary electrophoresis*, Electrophoresis 33 (2012) 19-20, 3095.
24. [H9] **E. Kłodzińska**, W. Kubczyk, M. Jackowski, B. Buszewski: *Capillary electrophoresis in the diagnosis of surgical site infections*, Electrophoresis 22-23 (2013) 3206-3213.
25. M. Jackowski, J Szeliga, W. Kupczyk, **E. Kłodzińska**, B. Buszewski: *Clinical application of a rapid microbiological test based on capillary zone electrophoresis to assess local skin infection*, BMC Microbiology, 4 (2011) 467.
26. M. Szumski, **E. Kłodzińska**, B. Buszewski: *Application of a fluorescence stereomicroscope as an in-line detection unit for electrophoretic separation of bacteria*, Microchimica Acta, 164 (2009) 287-291.

Ewa Kłodzińska

Toruń, 27 listopada 2015 r.