

TYTUŁ:

Protokół do identyfikacji i badania wrażliwości na środki przeciwdrobnoustrojowe bakterii izolowanych z miejskich placów zabaw

AUTORZY I AFILIACJE:

Ilona Sadok¹, Rafał Łopucki², Marcin Skowronek²

¹Katedra Chemii, Instytut Nauk Biologicznych, Wydział Medyczny, Katolicki Uniwersytet Jana Pawła II w Lublinie, Lublin, Polska

²Katedra Biomedycyny i Badań Środowiskowych, Instytut Nauk Biologicznych, Wydział Medyczny, Katolicki Uniwersytet Jana Pawła II w Lublinie, Lublin, Polska

ADRESY E-MAIL WSPÓŁAUTORÓW:

Ilona Sadok ilonasadok@kul.lublin.pl; ORCID: 0000-0003-1154-7581

Rafał Łopucki lopucki@kul.pl; ORCID: 0000-0003-2137-8742

Marcin Skowronek marcin.skowronek@kul.pl; ORCID: 0000-0003-2069-0347

AUTOR KORESPONDENCYJNY:

Ilona Sadok ilonasadok@kul.lublin.pl

SŁOWA KLUCZOWE:

plac zabaw; bakterie; antybiotykooporność; antybiotyki; MALDI-TOF MS; metoda dyfuzyjno-krażkowa

STRESZCZENIE:

Protokół wskazuje w jaki sposób określać obecność lekoopornych szczepów bakterii na różnych elementach wyposażenia i nawierzchni placów zabaw oraz w bioaerozolu. W dokumencie opisano między innymi procedurę identyfikacji izolatów bakterii z wykorzystaniem techniki MALDI-TOF MS oraz oprogramowania Bruker BioTyper, a także główne etapy testu oceny wrażliwości na środki przeciwdrobnoustrojowe metodą dyfuzyjno-krażkową.

PROTOKÓŁ:

1. Pobieranie wymazów z powierzchni wyposażenia placów zabaw i nawierzchni:

ZASADY OSTROŻNOŚCI: Zebrane próbki mogą zawierać patogeny. Zadbaj o odpowiednią ochronę – załóż rękawiczki.

UWAGA: Stosuj jedynie sterylne reagenty i pojemniki.

- 1.1. Przygotuj sterylną wymazówkę w probówce transportującej, sterylny roztwór NaCl (0,9%; w/v), wodoodporny pisak oraz lodówkę transportową. Wybierz liczbę i rodzaj powierzchni, z których będą pobierane próbki.
- 1.2. Zwilż sterylną wymazówkę w sterylnym roztworze NaCl (0,9%; w/v).
- 1.3. Pocieraaj wybraną powierzchnię elementów wyposażenia placów zabaw wymazówką przez minimum 2 minuty.
- 1.4. Umieść wymazówkę w sterylnej probówce transportującej, przechowuj próbkę w 4 °C i przetransportuj ją jak najszybciej do laboratorium.

2. Pobieranie próbek podłoża z placów zabaw:

ZASADY OSTROŻNOŚCI: Zebrane próbki mogą zawierać patogeny. Zadbaj o odpowiednią ochronę – załóż rękawiczki.

UWAGA: Stosuj jedynie sterylne pojemniki.

- 2.1. Przygotuj sterylne pojemniki polipropylenowe o pojemności 50 mL, wodoodporny pisak oraz lodówkę transportową. Należy zwrócić uwagę na wybór miejsc, z których zostaną pobrane próbki.
- 2.2. Pobierz piasek lub próbkę gleby z warstwy powierzchniowej na głębokości 1-10 cm bezpośrednio do 50 mL sterylnego pojemnika polipropylenowego.
- 2.3. Zbierz materiał tego samego typu z trzech różnych miejsc z terenu placu zabaw i następnie zmieszaj je w jednym pojemniku.
- 2.4. Umieść pojemnik z próbką gleby lub piasku w lodówce transportowej (w temperaturze 4 °C) i przetransportuj ją jak najszybciej do laboratorium.

3. Pobór bioaerozolu:

ZASADY OSTROŻNOŚCI: Zebrane próbki mogą zawierać patogeny. Zadbaj o odpowiednią ochronę – załóż rękawiczki.

- 3.1. Użyj przenośnego pobornika powietrza w celu pobrania zanieczyszczeń biologicznych obecnych w powietrzu na terenie placu zabaw.
- 3.2. Zainstaluj sterylne kielichy zawierające odpowiedni płyn do poboru próbek.

UWAGA: Niezbędne zużywalne akcesoria do pobornika próbek (kielichy, nakrętki, dawki płynu kolekcyjnego) mogą być zakupione od producenta urządzenia.

UWAGA: Stosuj jedynie sterylne reagenty i pojemniki.

- 3.3. Umieść pobornik na wysokości ok. 80-100 cm powyżej powierzchni ziemi.

UWAGA: Ta wysokość odpowiada średniej wysokości 2-3-letniego dziecka, które zazwyczaj przebywa na placu zabaw.

- 3.4. Pobierz bioaerozol przez 10 minut z prędkością poboru 250 L/min.

UWAGA: Każda próbka zawiera bioaerozol zawieszony w 2 500 L powietrza.

- 3.5. Zabezpiecz kielich pobornika zawierający płyn zakrętką, przechowuj w 4 °C i przetransportuj do laboratorium.

4. Oznaczenie liczby jednostek tworzących kolonię (jtk) w wymazach:

ZASADY OSTROŻNOŚCI: Zebrane próbki mogą zawierać patogeny. Zadbaj o odpowiednią ochronę i prowadź eksperymenty pod komorą laminarną.

UWAGA: Stosuj jedynie sterylne reagenty i pojemniki.

- 4.1. Używając jałowych nożyczek odetnij bawełnianą końcówkę wymazówki zawierającą materiał biologiczny, umieść ją w 1 mL sterylnego roztworu 0,9% (w/v) NaCl.
- 4.2. Wymieszaj przez 1 minutę.
- 4.3. Przygotuj 10-krotne rozcieńczenia z wykorzystaniem sterylnego roztworu 0,9% (w/v) NaCl.

UWAGA: Upewnij się, że każde rozcieńczenie jest dobrze wymieszane (przez minimum 15 sekund). Używaj jednorazowych końcówek do pipet automatycznych.

- 4.4. Rozprowadź 0,1 mL z każdego rozcieńczenia na płytkę z agarem trypsynowo-sojowym.
- 4.5. Inkubuj płytki w 37 °C przez 48 godziny.

- 4.6. Zlicz wszystkie kolonie z płytek, na których liczba kolonii wynosi od 30 do 300.
- 4.7. Wyraź liczbę jednostek tworzących kolonię w mililitrze (jtk/mL).

5. Hodowle mikrobiologiczne z próbek wymazów i podłoża:

ZASADY OSTROŻNOŚCI: Zebrane próbki mogą zawierać patogeny. Zadbaj o odpowiednią ochronę i prowadź eksperymenty pod komorą laminarną.

UWAGA: Stosuj jedynie sterylne reagenty i pojemniki.

- 5.1. Używając jałowych nożyczek odetnij bawełnianą końcówkę wymazówki z materiałem biologicznym, umieść w probówce zawierającej 5 mL sterylnego bulionu trypsynowo-sojowego.
- 5.2. Umieść próbkę podłoża (gleby, piasku) w kolbie zawierającej 100 mL sterylnego bulionu trypsynowo-sojowego.
- 5.3. Inkubuj w 37 °C przez 24 godziny.
- 5.4. Przy użyciu ezy nanieś otrzymaną zawiesinę bakteryjną metodą posiewu redukcyjnego na płytki z selektywnymi podłożami chromogennymi dedykowanymi dla bakterii będących przedmiotem badań np. *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Escherichia* itp.

UWAGA: Zastosowanie selektywnych pożywek nie wyklucza wzrostu innych rodzajów mikroorganizmów.

- 5.5. Inkubuj płytki w temperaturze 37 °C przez 24 godziny.
- 5.6. Za pomocą ezy pobierz pojedynczą izolowaną kolonię o odpowiedniej barwie (zgodnie z informacją zawartą w instrukcji dla danego podłoża) i zaszczep nią 5 mL sterylnego bulionu trypsynowo-sojowego.

UWAGA: Hodowla na podłożu selektywnym i odpowiednia barwa kolonii nie gwarantują prawidłowej identyfikacji izolatu bakteryjnego. Identyfikację taksonomiczną należy potwierdzić innymi metodami, np. techniką MALDI-TOF MS.

- 5.7. Inkubuj płytki w 37 °C przez 24 godziny.
- 5.8. Przygotuj próbki do identyfikacji gatunkowej bakterii zgodnie z opisaną procedurą (patrz punkty 7 i 8) lub dodaj 20% (v/v) glicerolu i przechowuj bakterie w –80 °C do dalszego wykorzystania.

UWAGA: Bakterie zabezpieczone glicerolem można też przechowywać w temperaturze -20 °C, ale przez krótki okres (raczej tygodnie, a nie lata jak w przypadku -80 °C).

6. Hodowle mikrobiologiczne z próbek bioaerozolu:

- 6.1. Delikatnie wymieszaj płyn w kielichach zawierający materiał zebrany z powietrza.
- 6.2. Przenieś płyn do sterylnej probówki wirówkowej.
- 6.3. Odwiruj (8000 rpm, 15 minut).
- 6.4. Zlej płyn z nad osadu.
- 6.5. Prowadź hodowle bakteryjne z wykorzystaniem pozostałego osadu, tak jak to opisano w punkcie 5.
- 6.6. Przygotuj próbki zgodnie z protokołem do identyfikacji gatunkowej bakterii (patrz punkty 7 i 8) lub zabezpiecz izolaty bakteryjne do późniejszych analiz, tak jak to opisano w punkcie 5.8.

7. Namnażanie izolatów bakterii do identyfikacji gatunkowej techniką MALDI-TOF MS:

ZASADY OSTROŻNOŚCI: Zebrane próbki mogą zawierać patogeny. Zadbaj o odpowiednią ochronę i prowadź eksperymenty pod komorą laminarną.

UWAGA: Stosuj jedynie sterylne reagenty i pojemniki.

- 7.1. Umieść zamrożone i zabezpieczone glicerolem próbki bakterii w temperaturze pokojowej w celu rozmrożenia (ok. 20-30 minut). Pobierz próbkę za pomocą sterylnej ezy i posiej ją na płytce z agarem trypsynowo-sojowym.
- 7.2. Inkubuj płytki w 37 °C przez noc.

8. Przygotowanie próbek do identyfikacji gatunkowej bakterii z wykorzystaniem MALDI-TOF MS.

ZASADY OSTROŻNOŚCI: Standardowy zestaw ochrony osobistej powinien składać się co najmniej z fartucha i rękawiczek.

UWAGA: Wszystkie etapy należy wykonać pod komorą laminarną.

UWAGA: Do identyfikacji mikroorganizmów należy zastosować 24-godzinną hodowlę czystej kultury bakteryjnej.

- 8.1. Dodaj 150 µL sterylnej wody do 1,5 mL probówki wirówkowej.
- 8.2. Wykorzystując sterylną ezę pobierz odpowiednią ilość mikroorganizmów („oczko” ezy) do probówki ze sterylną wodą.
- 8.3. Używając pipety o pojemności 200µL, wymieszaj zawartość probówki poprzez 5-10-krotne pobieranie i wypuszczanie zawiesiny.
- 8.4. Dodaj 450 µL 100% etanolu do probówki. Wymieszaj zawartość probówki tak jak opisano to w punkcie 8.3.

UWAGA: Tak zabezpieczone próbki mogą być przechowywane w -80 °C przez 2 miesiące przed analizą MALDI-TOF MS.

- 8.5. Odwiruj (13 000 rpm, 5 minut).
- 8.6. Usuń rozpuszczalnik organiczny.
- 8.7. Wyszuszyć pozostały osad w 30 °C, aby pozbyć się pozostałości etanolu.
- 8.8. Dodaj 40-100 µL 70% (v/v) roztworu kwasu mrówkowego rozpuszczonego w ultraczystej wodzie do próbki z osadem bakteryjnym.

ZASADY OSTROŻNOŚCI: Kwas mrówkowy jest łatwopalny, toksyczny i żrący.

- 8.9. Wymieszaj przez 3 minuty.
- 8.10. Dodaj 40-100 µL acetonitrylu. Wymieszaj przez 1 minutę.

ZASADY OSTROŻNOŚCI: Acetonitryl jest łatwopalny. Może podrażniać oczy, nos, gardło i płuca.

- 8.11. Odwiruj (13 000 rpm, 3 minuty).
- 8.12. Nanieś 1 µL supernatantu na płytkę do analizy MALDI w 3 powtórzeniach. Pozostaw na powietrzu do wyschnięcia.
- 8.13. Pokryj każdą z próbek znajdującą się na płytce MALDI 1 µL matrycy HCCA.

UWAGA: Matryca HCCA oznacza nasycony roztwór kwasu α -cyjano-4-hydroksycynamonowego w standardowym rozpuszczalniku (50% acetonitryl; 47,5% ultraczysta woda; 2,5% kwas trifluoroctowy).

ZASADY OSTROŻNOŚCI: HCCA działa drażniąco na skórę i oczy.

ZASADY OSTROŻNOŚCI: Kwas trifluoroctowy powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu.

- 8.14. Pozostaw do wyschnięcia przez 2 minuty.
- 8.15. Nanieś 1 µL zawiesiny standardu bakteryjnego (z ang. Bacterial Test Standard, BTS) na jeden ze spotów na stalowej płytce do analizy MALDI-TOF.

UWAGA: Przygotuj standard bakteryjny zgodnie z informacjami podanymi przez producenta odczynnika i przechowuj w temperaturze $\leq -18^{\circ}\text{C}$.

- 8.16. Wykonaj kroki z punktów 8.13 i 8.14.
- 8.17. Przeprowadź analizę MALDI-TOF.

UWAGA: Analiza powinna zostać przeprowadzona do 24 godzin od przygotowania.

9. Gatunkowa identyfikacja bakterii z wykorzystaniem MALDI-TOF MS:

UWAGA: Protokół został opracowany pod analizy prowadzone z wykorzystaniem spektrometru mas BrukerDaltonik GmbH ultraflex MALDI-TOF/TOF sterowanym z wykorzystaniem oprogramowania flexControl.

UWAGA: Protokół opracowano do identyfikacji gatunkowej mikroorganizmów z wykorzystaniem oprogramowania MALDI BioTyper Compass.

UWAGA: Identyfikacja opiera się na porównaniu widm masowych uzyskanych dla badanej próbki z widmem referencyjnym dostępnym w bazie danych.

9.1. Umieść płytkę do analizy MALDI w spektrometrze mas.

9.2. Za pomocą programu flexControl dokonaj kalibracji spektrometru mas pracując z wykorzystaniem metody MBT.

UWAGA: Postępuj zgodnie z instrukcją oprogramowania.

UWAGA: Analizy prowadzone są w polaryzacji dodatniej w trybie liniowym rejestrując widma mas w zakresie m/z od 2000 do 20 000 Da.

9.3. Zarejestruj widma mas dla każdej próbki.

UWAGA: Postępuj zgodnie z instrukcją oprogramowania.

9.4. Otwórz program BioTyper Compass. Przeanalizuj uzyskane widma mas.

UWAGA: Postępuj zgodnie z instrukcją oprogramowania.

UWAGA: Oprogramowanie umożliwia porównanie widm mas dla nieznanego organizmu z widmem referencyjnym dostępnym w bibliotece.

9.5. Wygeneruj raport.

9.6. Dokonaj interpretacji wyników bazując na instrukcji zamieszczonej w utworzonym raporcie.

UWAGA: Zazwyczaj, dopasowanie wyniku z prawdopodobieństwem na poziomie ≥ 2.0 jest akceptowalne dla identyfikacji na poziomie gatunku, natomiast wyniki w zakresie 1.7-2.0 są akceptowalne w przypadku dopasowania do rodzaju. Wyniki poniżej 1.7 powinny być uznane za niewiarygodne.

UWAGA: Jeżeli nie dokonano poprawnej identyfikacji gatunkowej, należy powtórzyć protokół przygotowania próbki, stosując nową subkulturę bakterii, w przeciwnym razie izolat należy zidentyfikować przy użyciu innej metodologii.

10. Ocena wrażliwości na leki metodą dyfuzyjno-krażkową:

10.1. Przygotuj płytki z agarem Mueller-Hinton'a.

UWAGA: Przygotuj podłoże Mueller-Hinton'a zgodnie z instrukcją producenta (ok. 25 mL płynnego podłoża na płytkę o średnicy 100 mm).

UWAGA: Przygotuj oddzielną płytkę dla każdego badanego mikroorganizmu.

10.2. Przygotuj inokulum.

UWAGA: Do eksperymentów wybierz izolaty bakterii zidentyfikowane z wysokim stopniem prawdopodobieństwa (≥ 2.0) techniką MALDI-TOF MS.

10.3. Przenieś izolaty bakterii do 3-5 mL bulionu tryptonowo-sojowego.

10.4. Inkubuj bullion w 35 °C przez 24 godziny.

10.5. Przenieś 50-100 μ L zawiesiny bakterii do 3-5 mL roztworu NaCl (0,9%, w/v). Wymieszaj.

10.6. Przygotuj densytometr przeznaczony do pomiaru zmętnienia zawiesiny bakteryjnej w jednostkach McFarlanda. Ustaw gęstość zawiesiny bakterii na 0,5 stopnia w skali McFarland'a.

UWAGA: Jeśli zawiesina przekroczy gęstość 0,5 stopnia w skali McFarland'a, dodaj roztworu NaCl by uzyskać odpowiednią gęstość.

UWAGA: Wykorzystaj zawiesinę do wykonania posiewu w czasie 15 minut od przygotowania.

10.7. Zanurz sterylny patyczek z wacikiem bawełnianym w probówce z inokulum.

UWAGA: Wacik nie powinien być zbyt mokry.

10.8. Zaszczep powierzchnię płytki agarowej Muellera-Hinton'a bakteriami.

UWAGA: Przesuwaj wacik ruchem w przód i w tył bardzo blisko siebie. Poruszaj się w poprzek i w dół płyty. Obróć płytkę o 60° i powtórz tę czynność.

10.9. Wyrzuć patyczek do odpowiedniego pojemnika.

10.10. Pozostaw powierzchnię agaru do wyschnięcia na 3-5 minuty, ale nie dłużej niż 15 minut.

10.11. Podnieś pokrywkę i umieść na płytce agarowej Muellera-Hinton'a zaszczepionej bakteriami do 5 sztuk krążków impregnowanych środkiem przeciwdrobnoustrojowym używając sterylnej pensety. Mocno dociśnij krążki, aby zapewnić pełny kontakt z powierzchnią agaru.

UWAGA: W celu wyboru środków przeciwdrobnoustrojowych sprawdź rekomendacje CLSI. Krążki antybiotykowe można zakupić od dowolnego renomowanego dostawcy.

UWAGA: Wysterylizuj pensetęza pomocą alkoholu lub w płomieniu palnika.

UWAGA: Krążki powinny być rozmieszczone w odległości nie mniejszej niż 24 mm (mierzonych od środka do środka) na płytce z podłożem Mueller-Hinton'a.

UWAGA: Unikaj umieszczania krążków zbyt blisko krawędzi płytki z podłożem.

10.12. Odwróć płytki i umieść je w cieplarni w 35 °C na 16-24 godziny w zależności od rodzaju patogenu.

10.13. Użyj linijki lub suwmiarki, aby zmierzyć rozmiary stref zahamowania wzrostu bakterii wokół krążków z dokładnością do milimetra.

UWAGA: Uwzględnij średnicę krążka przy pomiarze.

10.14. Stosuj wytyczne CLSI w celu określenia akceptowalnych zakresów średnic zahamowania stref wzrostu bakterii i oceny wrażliwości danego szczepu bakterii na testowany środek przeciwdrobnoustrojowy.

Uwagi końcowe:

Dokument został opracowany w ramach realizacji projektu finansowanego przez Ministra Edukacji i Nauki w ramach program “Studenckie Koła Naukowe Tworzą Innowacje” (SKN/SP/570395/2023).

Dokument opisuje przykładową procedurę służącą do izolacji i identyfikacji lekoopornych szczepów bakterii z elementów wyposażenia, bioaerozolu i nawierzchni placów zabaw. Laboratorium badawcze chcące się posłużyć tym protokołem powinno zweryfikować zamieszczone treści i w razie potrzeby dostosować je, w celu spełnienia obowiązujących wymagań prawnych, norm systemu zarządzania jakością wyników i wymagań bezpieczeństwa.

Bibliografia:

Hudzicki J., 2009. *Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol*, American Society for Microbiology, 1.

Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (M100, 28th edition)*.

Michałkiewicz M., 2019. *Metody badań mikrobiologicznego zanieczyszczenia powietrza na terenach oczyszczalni ścieków? przegląd literaturowy*. Kosmos 68, 475.

Singhal N., Kumar M., Kanaujia P., Viridi J., 2015. *MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis*. Front Microbiol. 6, 791.