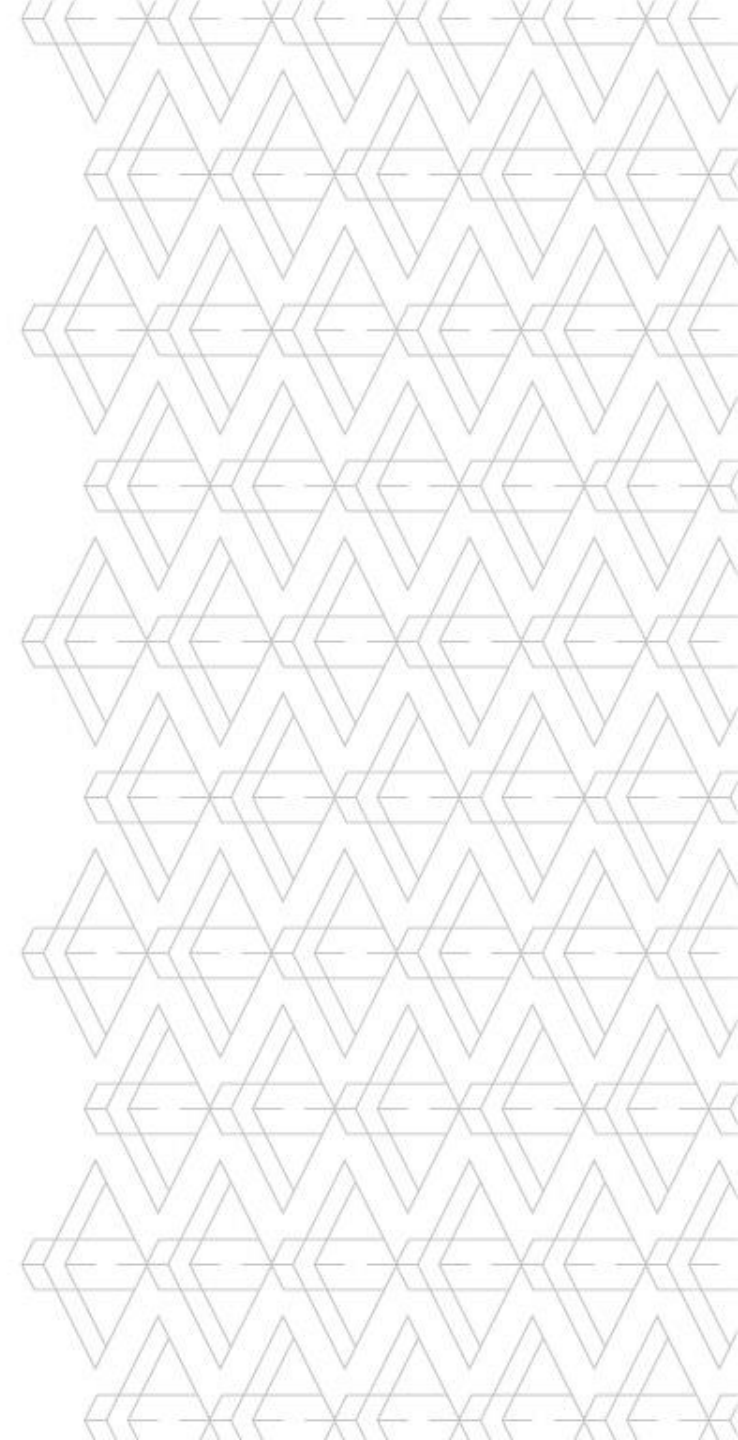




ARGENTA

Zastosowanie cytometrii przepływowej w mikrobiologicznych badaniach kosmetyków i żywności



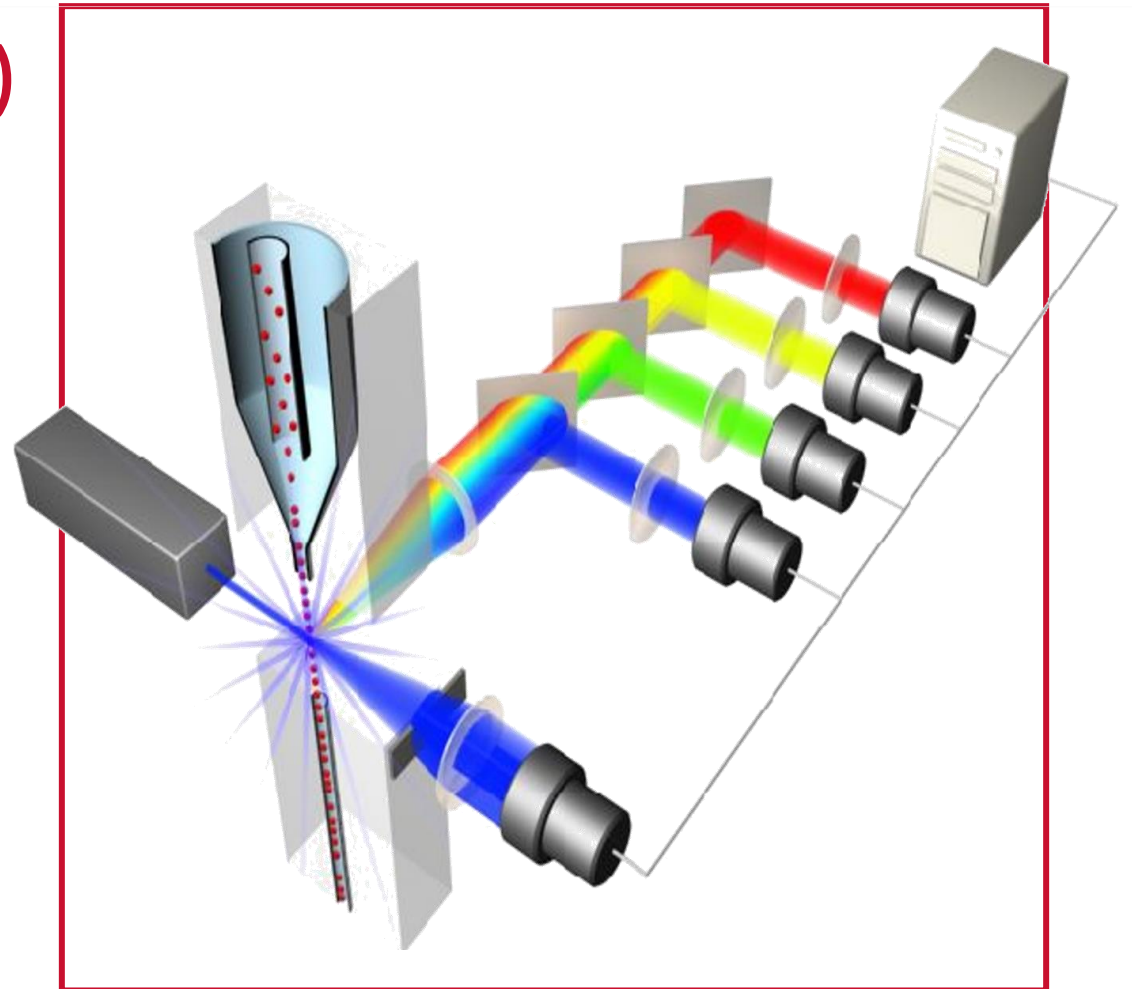
Agenda

1. Cytometria przepływowa (ang. *Flow Cytometry*, FCM)
2. Badane parametry komórek
3. Zjawiska fizyczne leżące u podstaw cytometrii przepływowej
4. Budowa i zasada działania cytometru przepływowego
5. Analiza próbek za pomocą FCM
6. Gdzie wykorzystuje się FCM?
7. Zalety i wady cytometrii przepływowej



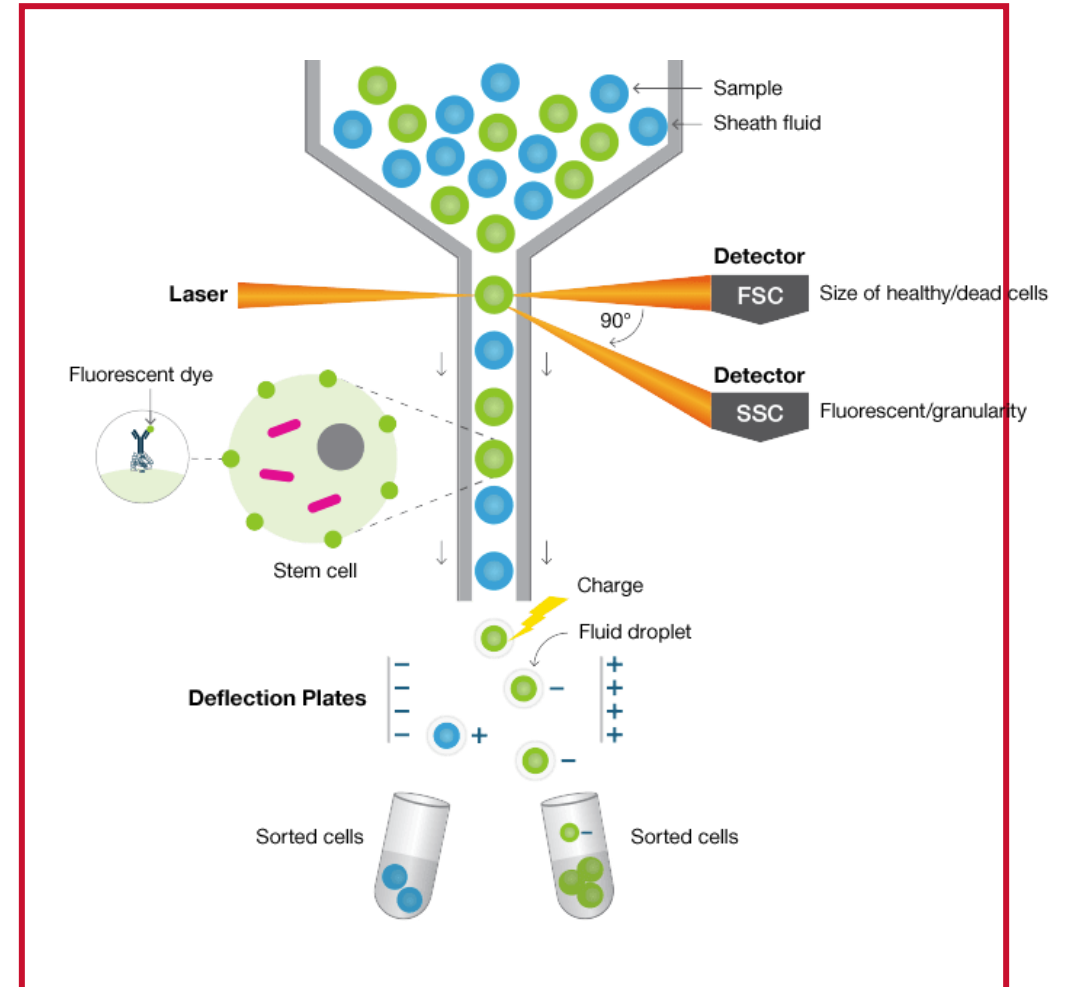
Cytometria przepływowa (ang. *Flow Cytometry*, FCM)

- **Flow cytometry** – pomiar pojedynczych komórek podczas ich przepływu
- Mierzone parametry: pomiar światła rozproszonego i sygnały fluorescencji
- Wykrywanie komórek i ich charakterystyka pod względem jakościowym oraz ilościowym.



Dlaczego FCM?

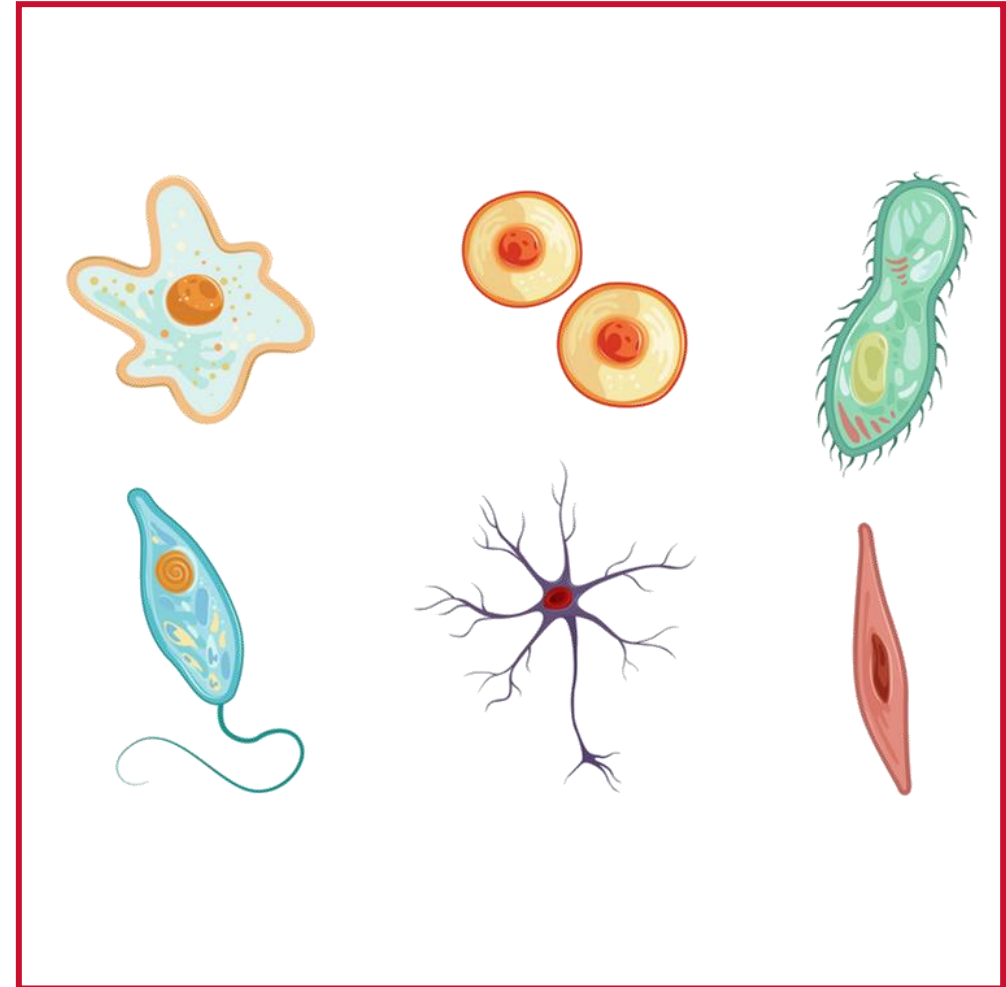
- Jednoczesna wieloparametrową analiza pojedynczych komórek.
- Możliwość sortowania i pozyskiwania do dalszych analiz określonych rodzajów komórek
- Szybka metoda i prosty w obsłudze sprzęt



ARGENTA

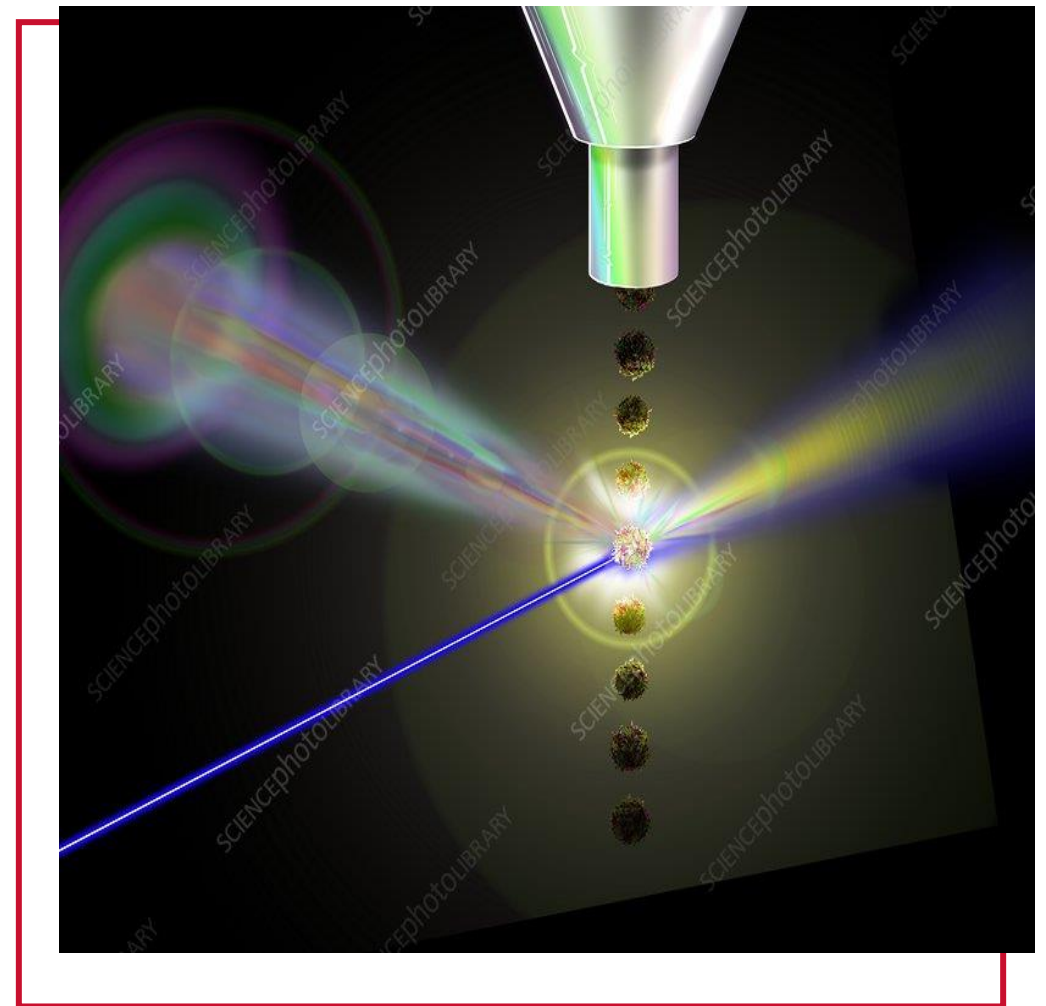
Badane parametry komórek

- Komórki każdego typu (0,2-150 μm) oraz ich struktury wewnątrzkomórkowe: bakterie Gram-dodatnie, Gram-ujemne, pleśnie, grzyby, komórki krwi
- Cechy morfologiczne (wielkość, ziarnistości cytoplazmatyczne)
- Parametry funkcjonalne komórek (potencjał błonowy, wewnątrzkomórkowe pH)
- Oddziaływania pomiędzy cząsteczkami w komórce, np. białko-białko, białko-DNA



Zjawiska fizyczne leżące u podstaw cytometrii przepływowej

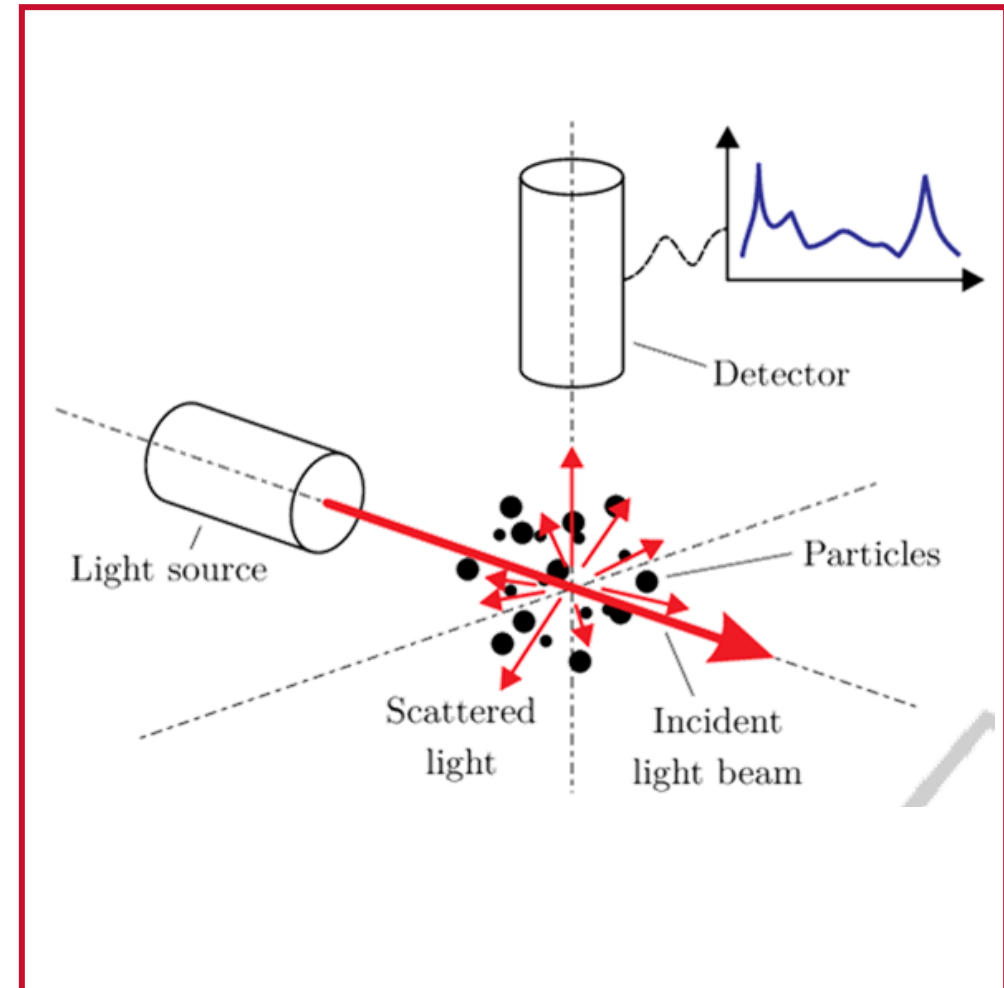
1. Rozpraszanie światła
2. Fluorescencja
3. Przepływ laminarny – ogniskowanie hydrodynamiczne



ARGENTA

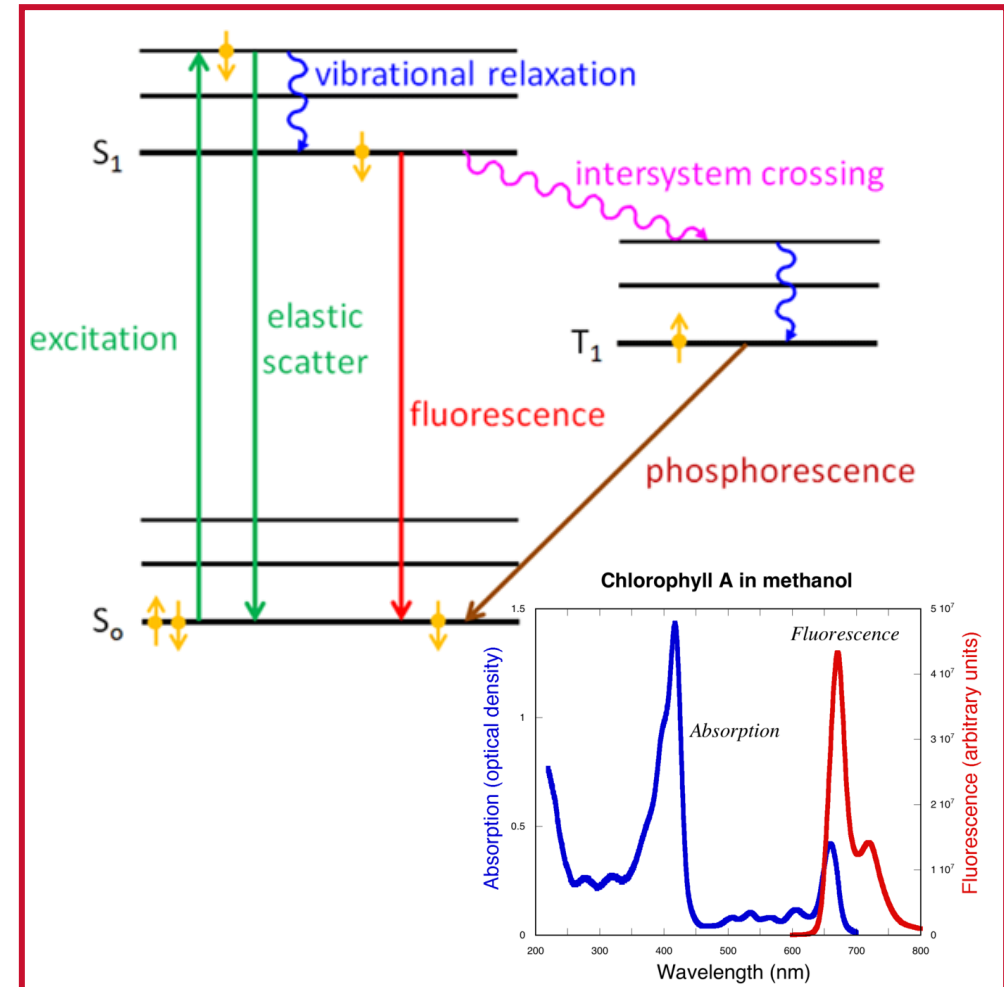
Rozpraszanie światła

- Zjawisko oddziaływania światła z materią, podczas którego występuje zmiana kierunku rozchodzenia się światła
- Natężenie światła w detektorze jest proporcjonalne do rozmiaru cząstki rozpraszającej
- Korelacja pomiędzy długością fali światła laserowego a stopniem rozpraszania



Fluorescencja

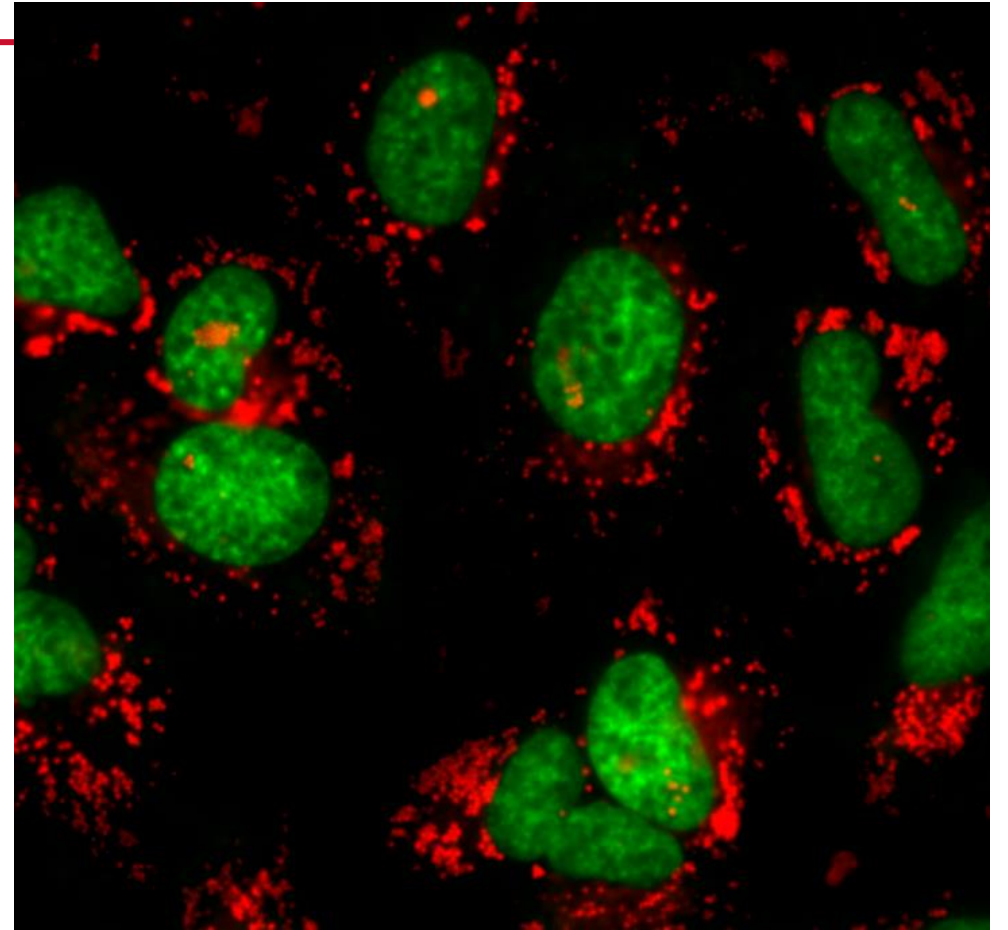
- Źródło światła (np. laser) pada na cząsteczkę (fluorochrom/barwnik fluorescencyjny)
- Fluorochrom pochłania kwanty światła o określonej energii i przechodzi na wyższy poziom energetyczny (absorpcja)
- Wzbudzony fluorochrom powracając do podstawowego stanu energetycznego, oddaje energię, czemu towarzyszy krótkotrwała emisja fotonów – fluorescencja



ARGENTA

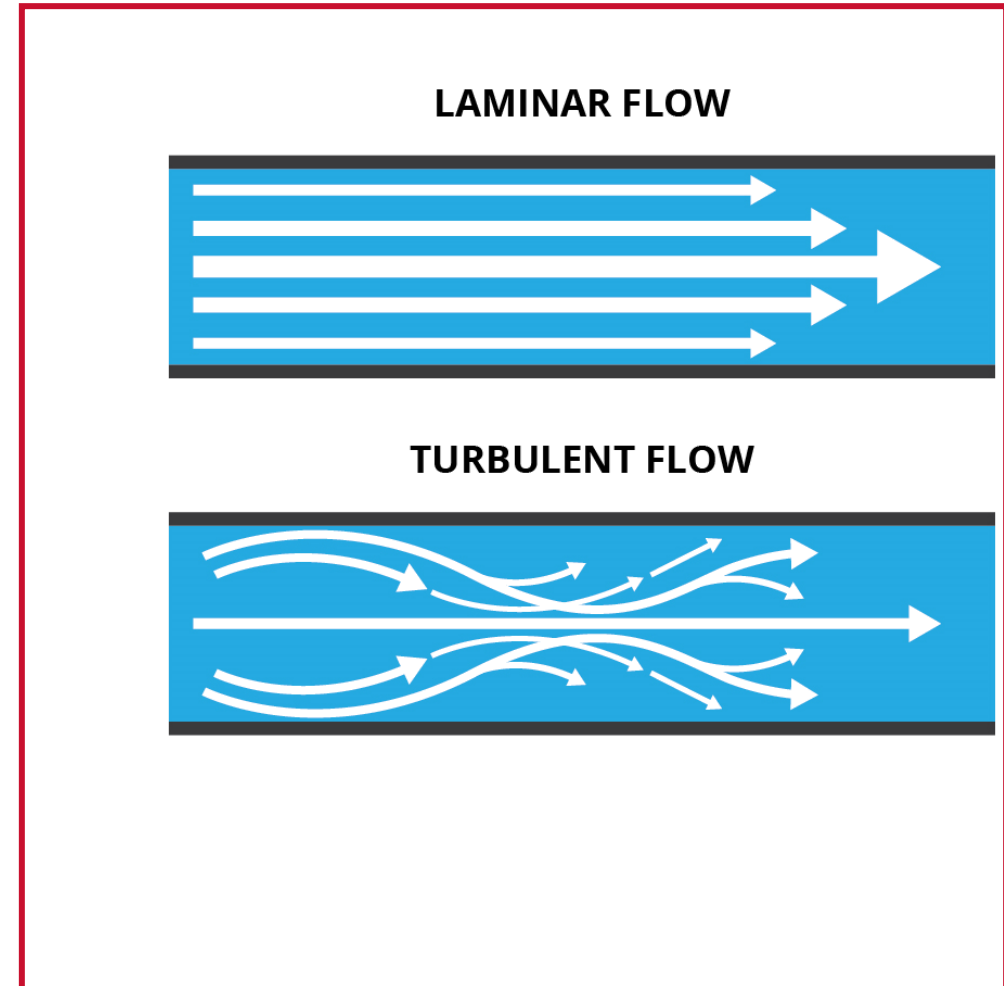
Fluorescencja

- Fluorochromy: naturalne lub sztuczne
- Metody aktywacji fluorescencji: bezpośrednia i pośrednia
- Do znakowania komórek stosowane są np. przeciwciała lub lektyny sprzężone z fluorochromem, białka fluorescencyjne
- W CFM badane komórki znakowane są w procesie barwienia (przed pomiarem)



Przepływ laminarny

- Przepływ uwarstwiony
- Uporzędkowany przepływ płynu lepkiego, w którym elementy płynu poruszają się po torach równoległych
- Występuje przy małych prędkościach przepływu
- Uzyskuje się m.in. dzięki ogniskowaniu hydrodynamicznemu
- Stała prędkość przepływu strumienia pojedynczych komórek 10^3 cząstek/s
- Stabilny przepływ umożliwia analizę sygnałów w czasie



Budowa cytometru przepływowego

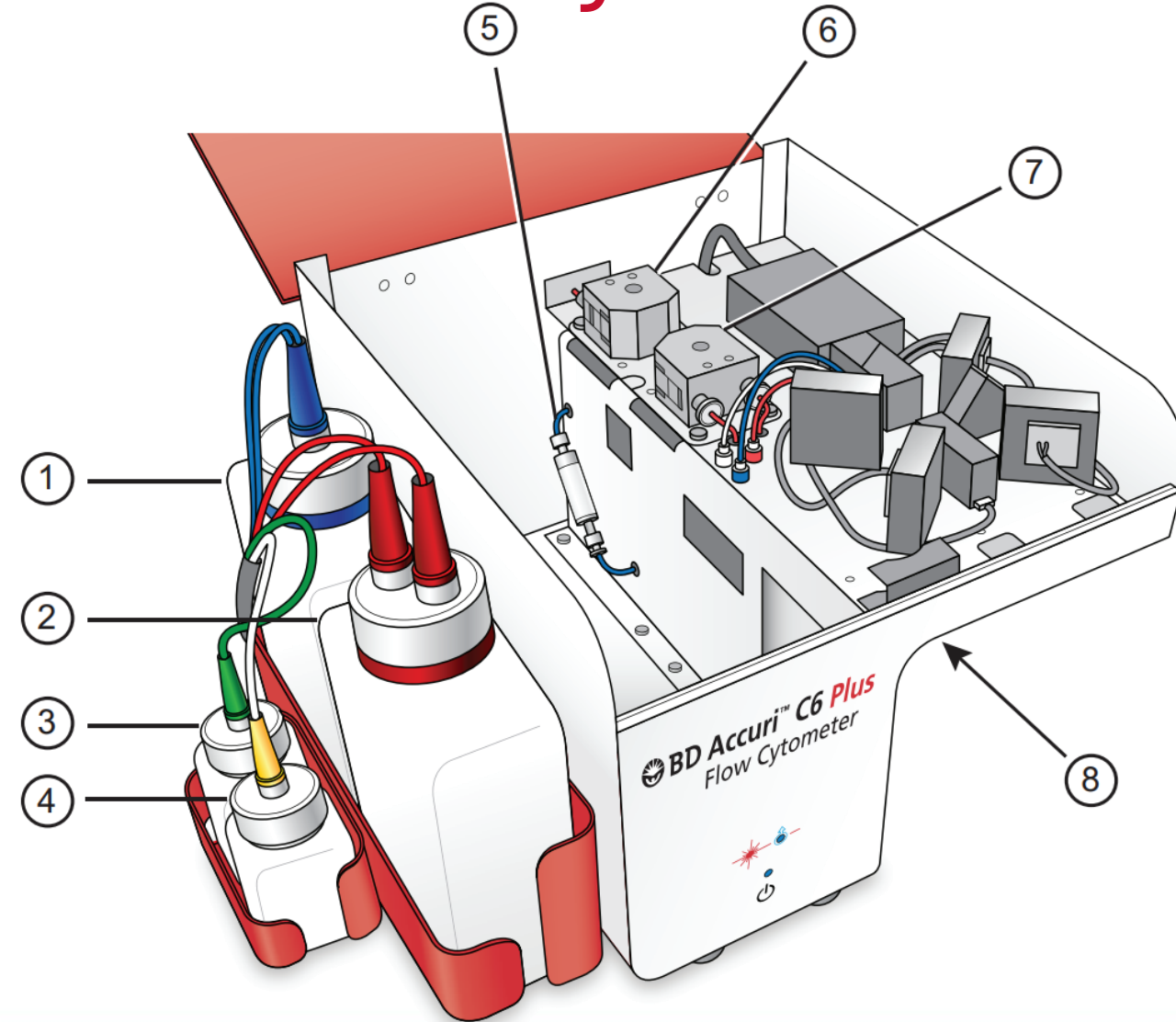
Typowe elementy cytometru:

- Układ hydrodynamiczny
- Układ optyczny (laser, detektory)
- System pomp
- Automatyczny układ podawania próbki (opcja)
- Pozostała elektronika sterująco-rejestrująca

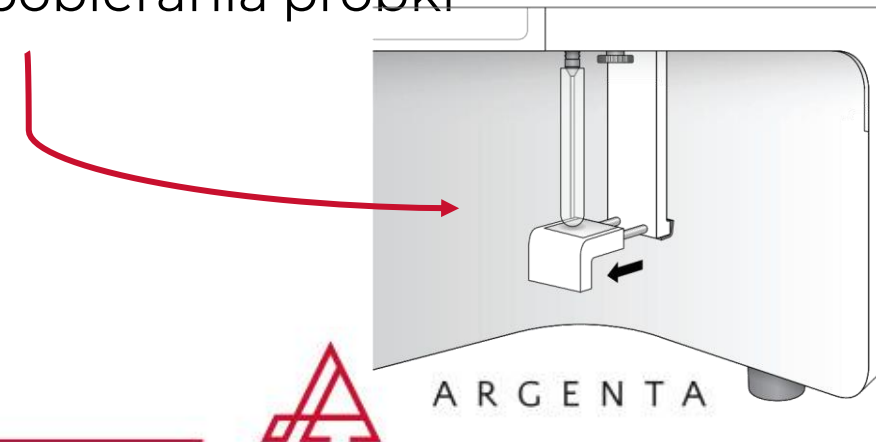


ARGENTA

Budowa cytometru cz. 1



- 1) Pojemnik z płynem osłonowym (sheath)
- 2) Pojemnik na zanieczyszczenia
- 3) Pojemnik z detergentem
- 4) Pojemnik z roztworem czyszczącym
- 5) Wewnętrzny filtr do płynu osłonowego
- 6) Pompa do płynu osłonowego
- 7) Pompa na zanieczyszczenia
- 8) Miejsce pobierania próbki



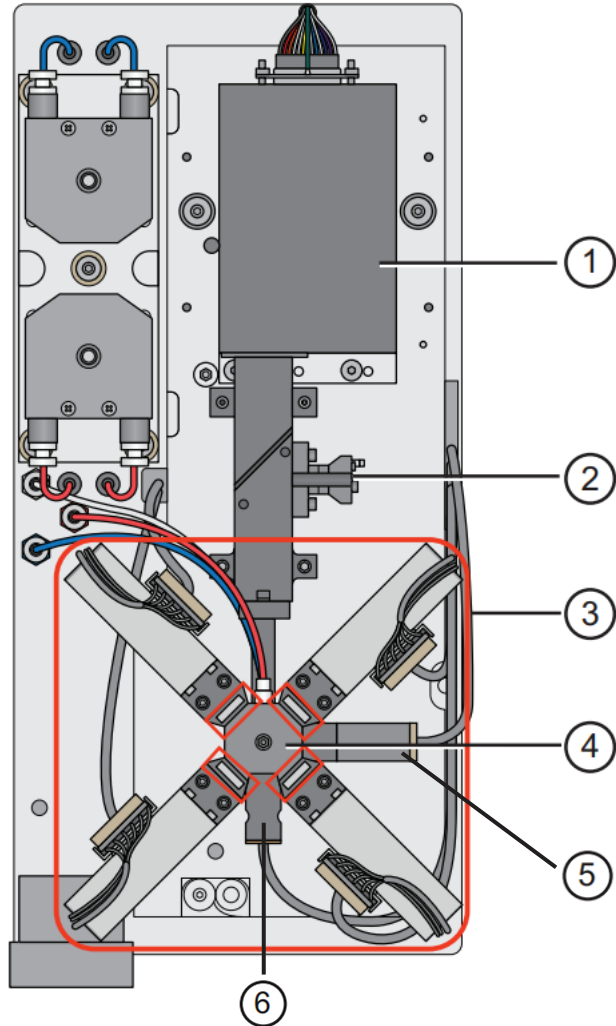
ARGENTA

Układ optyczny

- Jedna lub kilka linii laserowych
- Filtry pasmowe do selektywnej detekcji światła pochodzącego z fluorescencji
- Detektory światła rozproszonego rozmieszczone prostopadłe (SSC) i równoległe do wiązki laserowej (FSC)
- Detektory fluorescencji ustawione diagonalnie



Budowa cytometru cz. 2



- 1) Laser niebieski (488 nm)
- 2) Laser czerwony (640 nm)
- 3) Układ optyczny składający się z 4 detektorów fluorescencji
 - FL1 585/40 nm
 - FL2 585/40 nm
 - FL3 >670 nm
 - FL4 675/25 nm
- 4) Komora przepływowa z miejscem pomiarowym (przecięcie się wiązki lasera ze strumieniem próbki)
- 5) Detektor światła rozproszonego prostopadle (SSC Side-scattered light)
- 6) Detektor światła rozproszonego w przód (FSC - Forward scattered light)

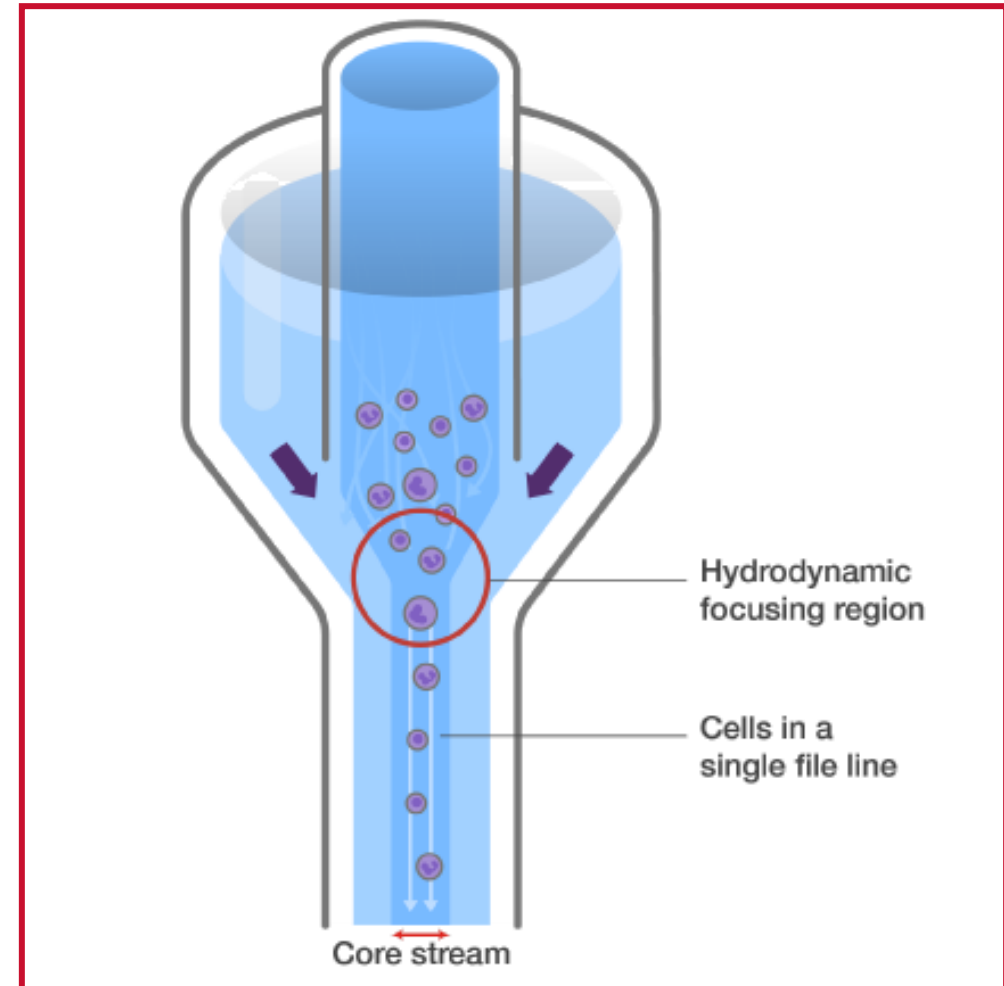
Przykładowa konfiguracja, możliwość zmiany filtrów



ARGENTA

Układ hydrodynamiczny

- Ogniskowanie hydrodynamiczne zapewnia przepływ laminarny
- Płyn osłonowy w kapilarze porusza się szybciej od płynu z próbką, formując w centrum kapilary stabilny strumień
- Jako płyn osłonowy często stosuje się wodę – niskie koszty i wysokie bezpieczeństwo



Analiza próbek



1

Wzbogacenie

Min. 48 h
Max. 96 h



2

Znakowanie komórek
barwnikami
fluorescencyjnymi, np. za
pomocą

METIS Fluo4Life®

+

Barwienie kontrastowe
(hamowanie naturalnej
autofluorescencji), np. z
wykorzystaniem

METISol Blue®



3

Liczenie i analiza badanych
komórek

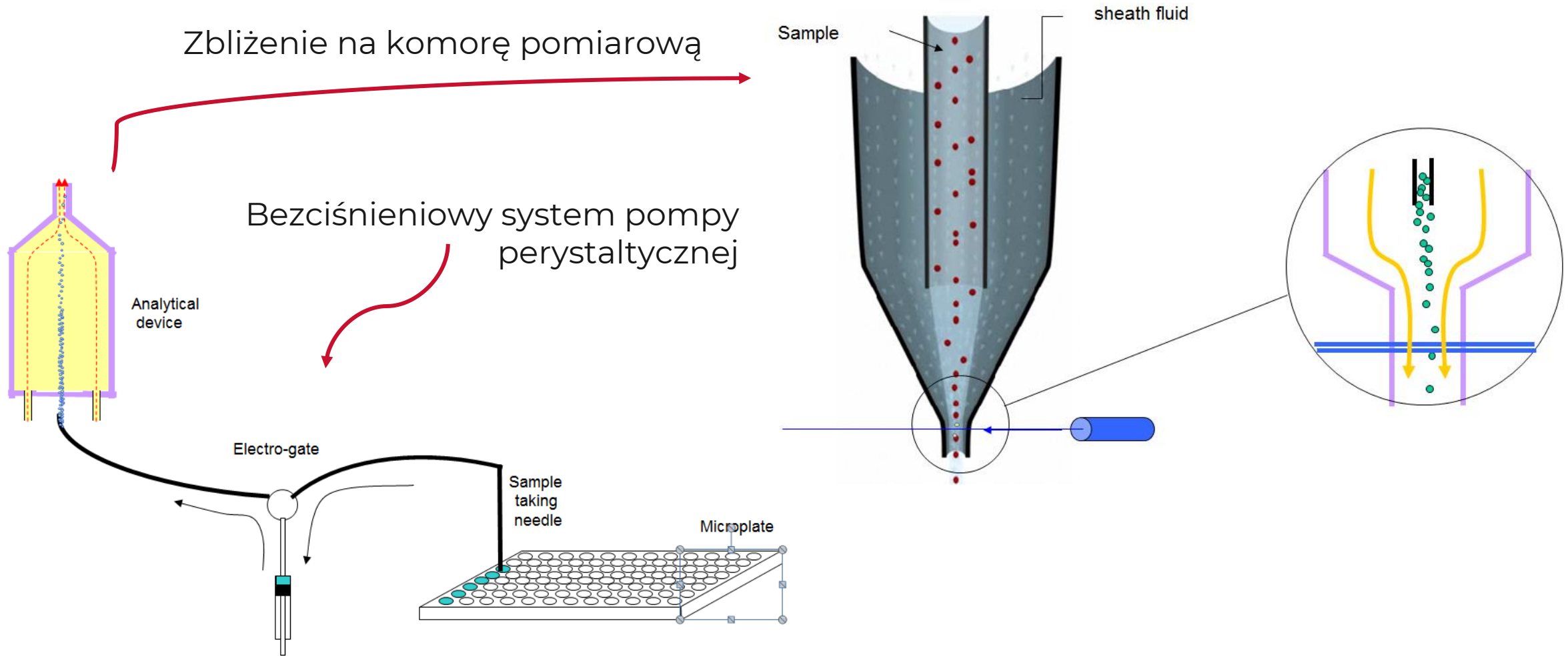


Analiza otrzymanych
wyników za pomocą
wbudowanych w
oprogramowanie
narzędzi.



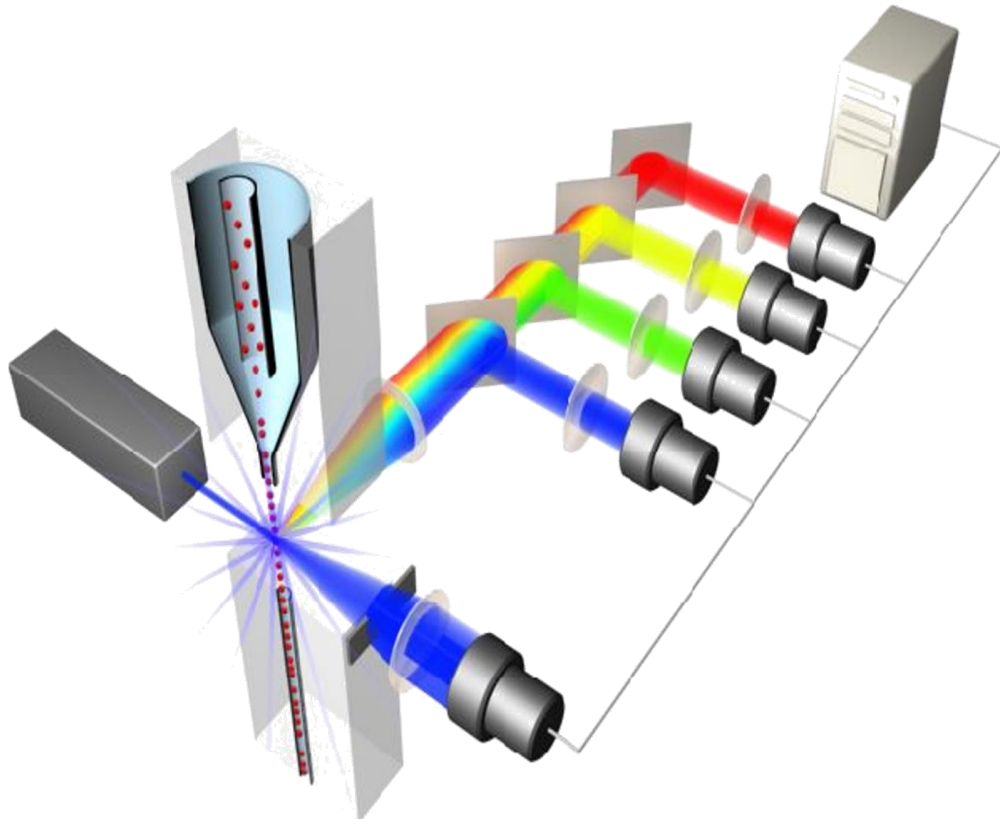
ARGENTA

Analiza na cytometrze cz.1



ARGENTA

Analiza na cytometrze cz.2



Wiązka lasera pod kątem 180°
(Detektor Przeciwległy „Forward
scatter”) → **wielkość**

Wiązka lasera pod kątem 90°
(Detektor prostopadły „Side
Scatter”) → **ziarnistość**

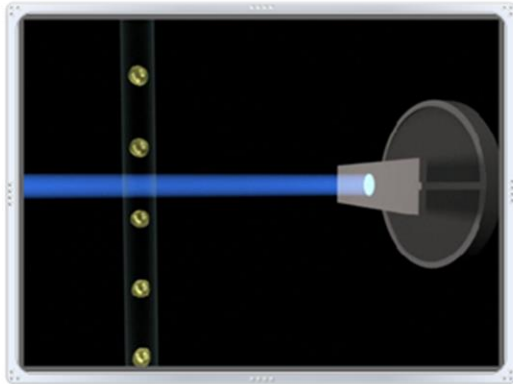


ARGENTA

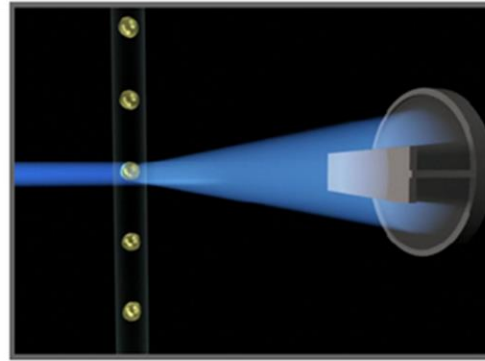
Analiza na cytometrze cz.2

2. Detektor prostopadły „Side Scatter”

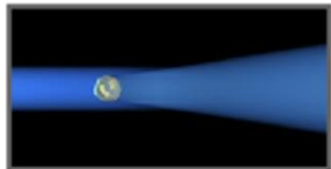
1. Detektor Przeciwległy „Forward scatter”



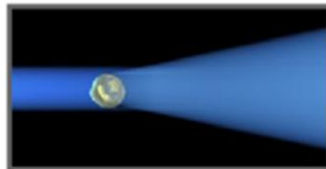
100% of laser light attain the detector



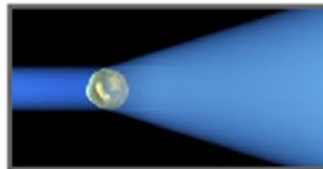
Diffraction of the light on the detector



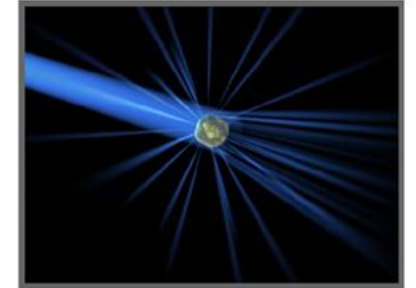
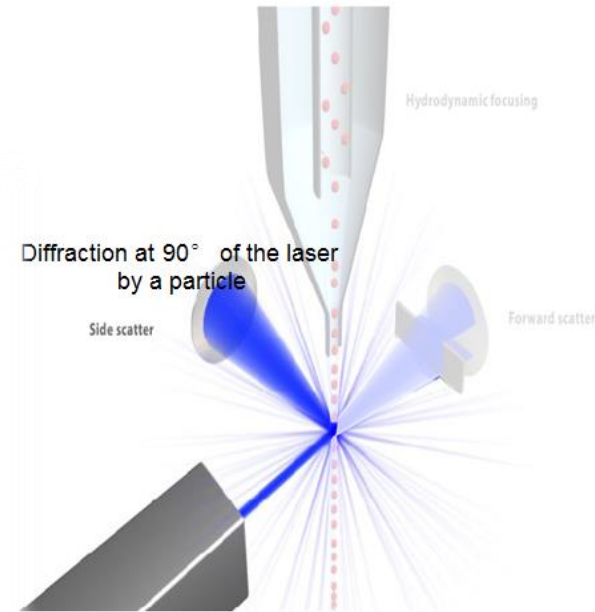
Diffraction generated by a small cell,



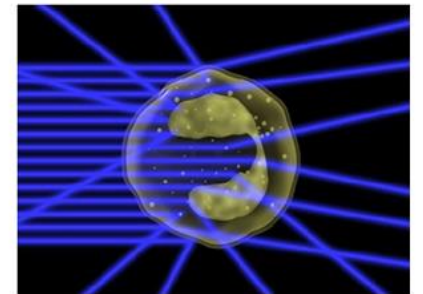
by a bigger cell



and by a cell even bigger



Diffraction of the laser in all direction

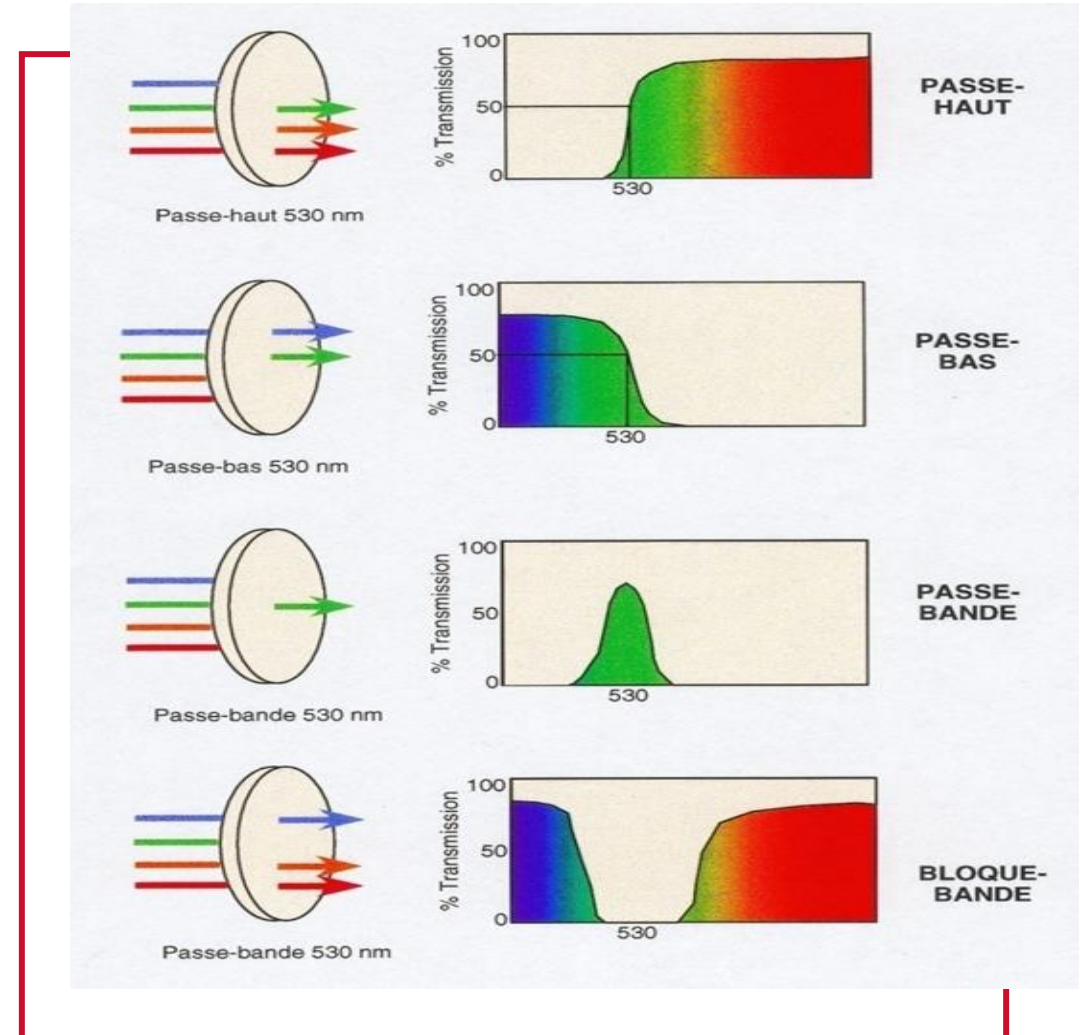


ARGENTA

Analiza na cytometrze cz.3

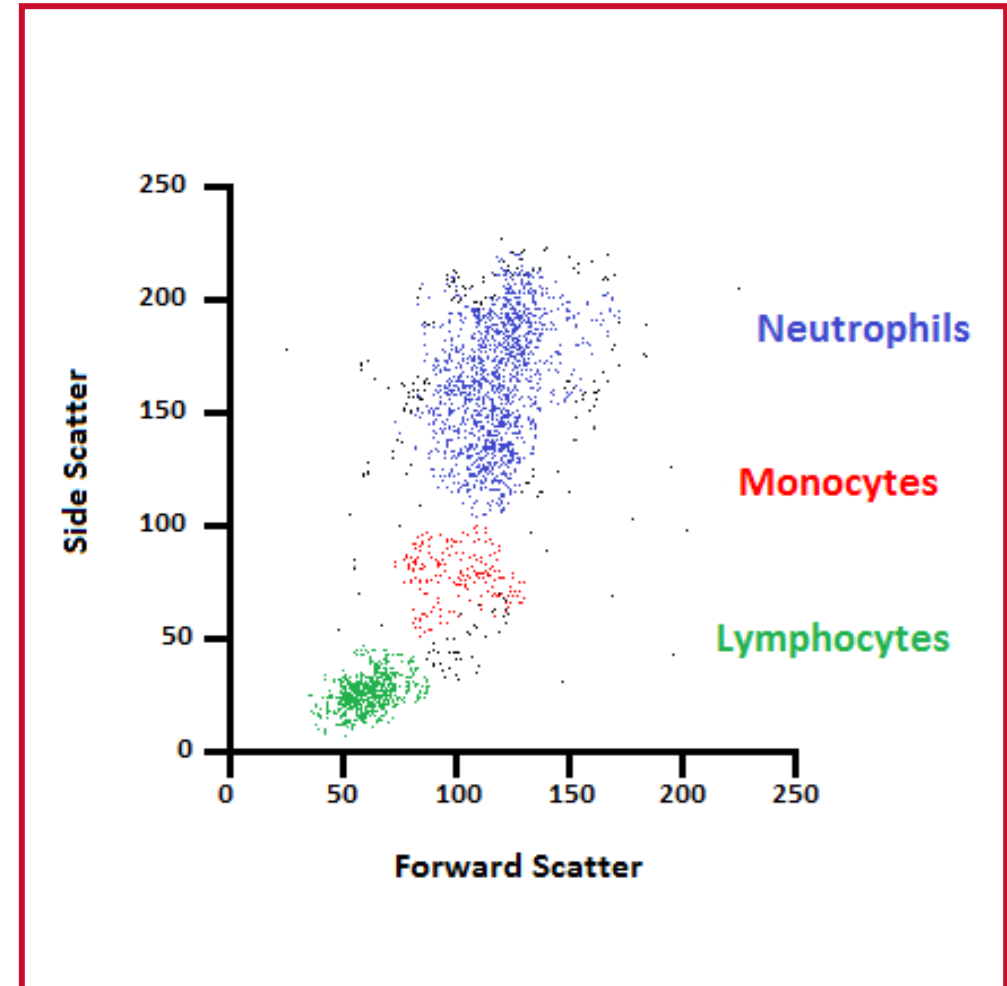
Filtry do detektorów bocznych

- Próbka, oznakowana wcześniej specjalnymi przeciwciałami sprzężonymi z barwnikami jest odczytywana za pomocą detektorów bocznych, przy użyciu filtrów przepuszczających tylko fale świetlne odpowiedniej barwy.
- Światło lasera powoduje wzbudzenie fluorochromu i dochodzi do fluorescencji we wszystkich komórkach



Przykładowy wynik pomiaru

- Podstawowym wykresem jest porównanie natężenia światła pomiędzy detektorami FSC oraz SSC
- Analiza danych i przebiegów czasowych pozwala pogrupować wyniki i przyporządkować im cechy odpowiednie dla danych komórek
- Dodatkowa detekcja fluorescencji identyfikuje specyficzne obszary, które umożliwiały przyłączenie fluorochormu



Zastosowanie FCM w przemyśle

- Aseptyczna produkcja żywności i napoi
- Produkty mleczne
- Produkty higieny osobistej
- Kosmetyki
- Niesterylne farmaceutyki
- Woda do przetwórstwa



ARGENTA

Zastosowanie FCM w bezpieczeństwie żywności i kosmetyków

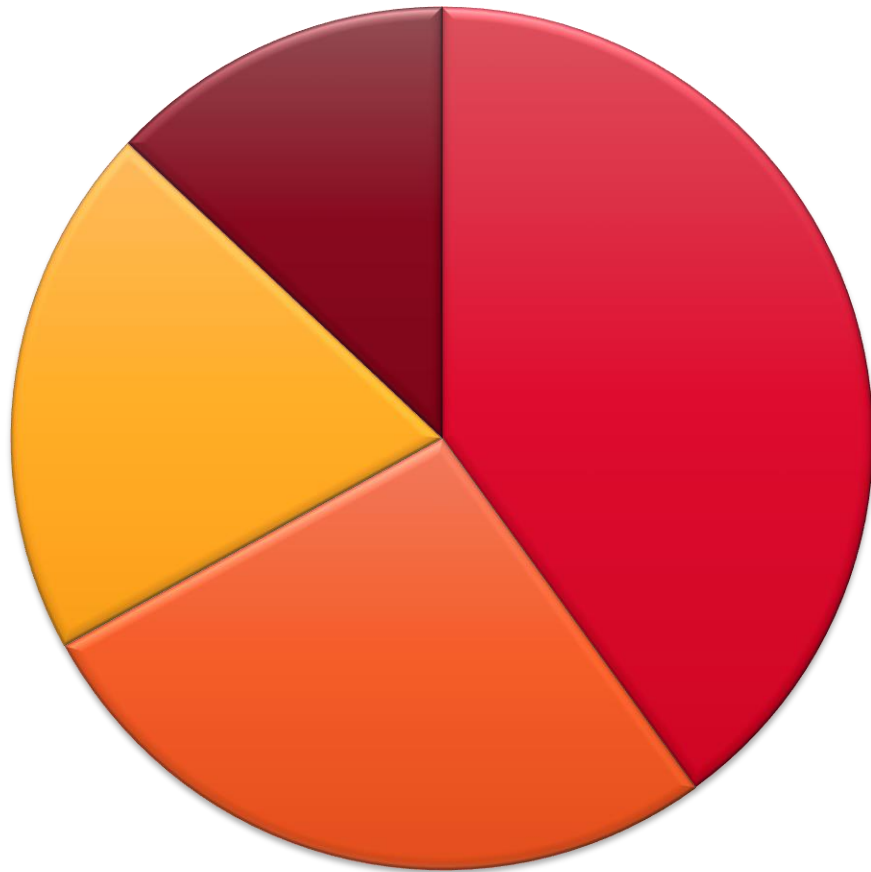
- Wyznaczenie ogólnej liczby drobnoustrojów (OLD)
- Detekcja drożdży i pleśni
- Detekcja mikroorganizmów acidofilnych i kwasoopornych
- Wykrywanie patogenów, np.:
 - *Listeria* spp.
 - *Listeria monocytogenes*
 - *Salmonella* spp.
 - *Legionella* spp.
 - *Staphylococcus aureus*
 - *Escherichia coli*
- Badanie (ilościowe i fizjologiczne) mikroorganizmów fermentacyjnych (np. *Lactobacillus* spp.)



ARGENTA

Kto korzysta z cytometrii przepływowej?

Statystyki globalne na rok 2020



■ Instytucje prywatne (40%)

■ Szpitale (27%)

■ Instytucje akademickie (20%)

■ Laboratoria kliniczne/diagnostyczne (13%)

Zalety i wady FCM

Zalety

Możliwość pominięcia etapu hodowli mikroorganizmów

Skrócenie czasu analiz – analiza pobranego materiału

Czułość – analiza pojedynczych obiektów z danej populacji

Precyzyjność analiz populacyjnych – pomiar wszystkich zawartych w próbce obiektów

Sortowanie analizowanych obiektów – dalsza Charakterystyka

Wieloparametryczność analizy obiektów – jednoczesny pomiar nawet kilkunastu cech

Szybkość pomiaru
(nawet do 100 000 obiektów/s)

Oszczędność czasu i minimalizacja kosztów – ograniczenie zużycia podłoży mikrobiologicznych

Wady

Konieczność przeprowadzenia próbki w stan zawiesin

Możliwość zapychania kapilar i przewodów cząsteczkami zanieczyszczającymi lub aglomeratami komórek

Konieczność usuwania cząstek zakłócających pomiar – wysokie tło utrudniające analizę

Brak informacji o przestrzennej dystrybucji fluorochromu w komórce – pomiar w postaci epifluorescencji



ARGENTA

Zalety ekonomiczne FCM



Oszczędność

Mniejsze obciążenie laboratoriów oraz wytwarzanie zanieczyszczeń.

Stabilność produkcji

Minimalizowanie przestojów produkcyjnych w przypadku wykrytego zanieczyszczenia lub niewłaściwych surowców

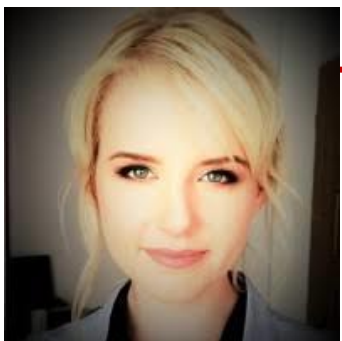
Wydajność

Zmniejszenie zapotrzebowania na powierzchnie magazynowe, zredukowanie czasu oczekiwania na wynik, wysoka czułość umożliwiająca wykrycie pojedynczych komórek



ARGENTA

Dziękuję za uwagę



Marta Koziel

Kierownik Produktu – Dział Przemysł

e: m.koziel@argenta.pl

m: +48 506 381 531