



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2019 00831

(22) Data de depozit: 02/12/2019

(41) Data publicării cererii:
30/06/2021 BOPI nr. 6/2021

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI,
ȘOS.PANDURI NR. 90, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• MARUȚESCU LUMINIȚA GABRIELA,
ALEEA LT. GHEORGHE STĂLNEANU,
NR.2, BL.2, SC.1, ET.3, AP.8, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;

• VELICAN ALEXANDRA MIHAELA,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI, NR.313D, SC.1,
AP.111, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• POPA MARCELA,
STR.GEORGE VÂLSAN, NR.6, BL.65, SC.2,
AP.99, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• KAMERZAN CRINA MARIA,
ALEEA SÂNDULEȘTI, NR.5, BL.E15, SC.1,
ET.10, AP.54, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
• CHIFIRIUC MARIANA-CARMEN,
STR.STAMATE COSTACHE NR.5, BL.A8,
SC.1, ET.9, AP.37, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) **METODĂ RAPIDĂ DE DIAGNOSTIC MICROBIOLOGIC
ȘI DE DETERMINARE A SENSIBILITĂȚII LA ANTIBIOTICE
A BACILILOR GRAM-NEGATIVI UROPATOGENI CU
AJUTORUL CITOMETRIEI ÎN FLUX**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de detectare a tulpinilor de *Escherichia coli* uropatogene și a sensibilității acestora la antibiotice în matrici artificiale și în probe clinice de urină. Metoda, conform invenției, constă în aplicarea analizei de citometrie în flux (CF) pe medii de cultură cu o compoziție similară unei probe de urină tratate cu diferite antibiotice, incubate la 37°C, timp de 4 h și apoi marcate cu iodură de propidiu, la o concentrație finală de 5 μg/ml, respectiv, probe de urină de la donatori sănătoși contaminate artificial, tratate cu diferite anti-

biotice, marcate cu DiBAC₄, la o concentrație finală de 0,5 μg/ml și incubate la întuneric, la 37°C, timp de 4 h, într-un timp de analiză a probelor de 2...6 h, cu valori ale sensibilității și specificității metodei CF de 100% pentru nitrofurantoin, 91,6% și 94,1% pentru ceftriaxon, 93,7 și 100% pentru ciprofloxacina și 85,7% și 100% pentru trimetoprim-sulfametoxazol.

Revendicări: 4
Figuri: 6



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2019 0831
Data depozit 02-12-2019

DESCRIEREA BREVETULUI: METODĂ RAPIDĂ DE DIAGNOSTIC MICROBIOLOGIC ȘI DE DETERMINARE A SENSIBILITĂȚII LA ANTIBIOTICE A BACILILOR GRAM - NEGATIVI UROPATOGENI CU AJUTORUL CITOMETRIEI ÎN FLUX.

Prezenta invenție se referă la elaborarea și optimizarea unei metode rapide bazate pe citometria în flux pentru detectarea tulpinilor de *Escherichia coli* uropatogene și a sensibilității acestora la antibiotice, în matrici biologice artificiale (urină artificială, urină infectată artificial) și în probe clinice de urină. O astfel de metodă ar putea fi pusă în aplicare cu ușurință în spitale, fiind deja utilizată pentru alte determinări în imunologie și hematologie, contribuind semnificativ la îmbunătățirea terapiei antiinfecțioase empirice, și consecutiv, la reducerea ratelor de morbiditate și mortalitate asociate infecțiilor severe precum și la limitarea apariției și răspândirii fenomenului de rezistență la antibiotice.

Metoda citometriei în flux (CF) a fost introdusă în anul 1940, iar aplicațiile în microbiologie au fost dezvoltate în anii 1980, odată cu progresele tehnologice și s-au extins în deceniile următoare, ca urmare a îmbunătățirii rezoluției echipamentului (Benjamin și colab., 2017). Spre deosebire de alte tehnici care implică studiul populațiilor microbiene după cultivare, CF oferă posibilitatea de a analiza rapid și individual mai mulți parametri ai unei populații de microorganisme, reușind să detecteze și să cuantifice diferențele structurale și funcționale individuale ale celulelor unei populații bacteriene. Semnalele optice colectate (lumina împrăștiată și fluorescența) și analizate se corelează cu diferite caracteristici ale celulelor analizate, structurale (mărime, granularitate) și funcționale (conținutul în acizi nucleici, expresia de proteine intracelulare și de suprafață celulară, potențialul de membrană, activitate enzimatică, expresia de pompe de eflux, integritatea membranei).

Metodele standard de testare a sensibilității la antibiotice se bazează pe evaluarea inhibiției creșterii patogenului și includ metode manuale (metoda disc difuzimetrică, metoda microdiluțiilor în mediu lichid) și automate, precum *Microscan Walkaway (Beckman Coulter)*, *Phoenix Automated Microbiology System (BD)* și *Vitek 2 (bioMérieux)*. Diferite metode bazate pe tehnica PCR, tehnicile de *microarray* și *whole-genome sequencing* au fost dezvoltate pentru detectarea rezistenței la antibiotice, însă acuratețea acestora rămâne inferioară testelor fenotipice convenționale. Timpul de analiză al metodelor standard utilizate pentru determinarea spectrului de sensibilitate la antibiotice este în general cuprins între 24 și 48 de ore, și se bazează pe creșterea agentului patogen. Informații preliminare privind spectrul de sensibilitate la antibiotice, înaintea rezultatelor testelor

standard, pot contribui la îmbunătățirea primei și celei mai importante etape a diagnosticului microbiologic al infecțiilor.

Problema pe care invenția actuală o rezolvă este scurtarea timpului de prelucrare a probei biologice și furnizarea raportului preliminar de analiză, care va permite alegerea tratamentului de urgență, în aproximativ 5 ore de la primirea probei în laborator. Bolile infecțioase reprezintă o problemă majoră de sănătate publică la nivel mondial din cauza emergenței rapide a rezistenței la antibiotice, amplificată, în cazul infecțiilor microbiene, de formarea biofilmelor microbiene și de numărul foarte limitat de noii agenți antimicrobieni [Anderson, 2006; Boucher, 2009; Coastes, 2011; European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) 2005 - 2014].

Infecțiile tractului urinar (ITU) sunt printre cele mai frecvente infecții bacteriene, atât în sectorul clinic, cât și în comunitate (Flores-Mireles et al., 2015). Tratamentul de urgență al ITU cu antibiotice la care bacteriile uropatogene sunt deja rezistente crește semnificativ selecția și diseminarea bacteriilor rezistente la antibiotice. În plus, practicile de prescripție empirică contribuie la creșterea rezistenței la antibiotice de ultimă elecție a bacililor Gram-negativi, amenințând eficiența acestora în tratamentul infecțiilor severe. Prin urmare, a devenit esențial ca antibioticele să fie utilizate în mod judicios și specific în tratamentul UTI (Schmiemann et al., 2010).

Soluția pe care o propune prezenta invenție este îmbunătățirea acurateții terapiei antimicrobiene de urgență în cazul ITU și reducerea semnificativă a timpului de analiză (a probelor până la 2-6 ore), comparativ cu metodele convenționale, bazate pe cultivarea agentului patogen.

Avantajele invenției:

- ❖ analiza rapidă a numeroase celule bacteriene;
- ❖ detectarea simultană a mai multor parametri la nivel de celulă individuală, precum și posibilitatea corelării diferiților parametri analizați, ceea ce permite detectarea și diferențierea mai multor populații și subpopulații de celule în proba analizată;
- ❖ reducerea semnificativă a timpului de analiză a probelor de urină comparativ cu metodele convenționale;
- ❖ eficiență cost-beneficiu în comparație cu metodele fenotipice și genotipice disponibile pentru testarea sensibilității la antibiotic și *screening*-ul/confirmarea mecanismelor de rezistență la antibiotice.

Se prezintă în continuare 6 exemple ale invenției în legătură cu figurile:

Fig. 1. Curba de creștere pentru identificarea timpului minim de incubare - reprezentarea grafică a densității optice care indică timpul minim de incubare pentru a obține creștere bacteriană și varianta experimentală optima selectată.

Fig. 2. Schema de lucru pentru prepararea probelor cu scopul de a valida protocolul de detectare a viabilității tulpinilor analizate.

Fig. 3. Cuantificarea valorilor MFI obținute prin 3 experimente independente folosind 30 tulpini de *E.coli* 1-30, expuse tratamentului cu ciprofloxacina.

Fig. 4. Reprezentarea grafică a raportului dintre intensitatea fluorescenței celulelor tratate cu nitrofurantoin (150 $\mu\text{g/ml}$), ceftriaxonă (4 $\mu\text{g/ml}$), ciprofloxacina (4 $\mu\text{g/ml}$), trimetropim-sulfametoxazol (100 $\mu\text{g/ml}$) și celulele netratate cu antibiotic- *Stain index (SI)*.

Fig. 5. Distribuția fluorescenței pentru tulpinile de *E.coli* 2559 și *E. coli* 3616 tratate cu antibiotice la diferite concentrații. Conturul negru indică controlul pozitiv (tulpina netratată cu antibiotic), iar conturul albastru indică populația bacteriană expusă la antibiotic.

Fig. 6. Reprezentarea grafică a procentului parametrilor de performanță obținuți pentru analiza prin CF a probelor de urină.

Se prezintă în continuare câteva exemple care descriu metoda propusă și eficiența acesteia pentru detectarea tulpinilor de *E. coli* uropatogene în urină artificială, urină provenită de la donatori sănătoși contaminată artificial și în probe clinice de urină.

EXEMPLUL NR. 1 PROCEDEU PENTRU DETECTAREA ȘI DETERMINAREA SENSIBILITĂȚII LA ANTIBIOTICE A TULPINILOR DE *ESCHERICHIA COLI* UROPATOGENE ÎN URINĂ ARTIFICIALĂ PRIN CITOMETRIE ÎN FLUX

Pentru optimizarea protocolului de detectare a microorganismelor și de testare a sensibilității la antibiotice, a fost elaborat un mediu de cultură cu o compoziție similară unei probe de urină, denumit în continuare **urină artificială (AUM)** (Tabelul 1).

Tabelul 1. Compoziția și caracteristicile fizico-chimice ale mediului AUM utilizat.

Parametri/ Compoziție	Concentrația componentelor	Unitate de măsură
pH	6.2	
Densitate	1.008	g/ cm ³
Osmolaritate	446	(mOsm/kg)
Uree	200	(mM)
Acid uric	1	(Mm)
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	5	(mM)
NaCl	54	(mM)
KCl	30	(mM)
NH ₄ Cl	15	(mM)
CaCl ₂	3	(mM)
MgSO ₄	2	(mM)
NaHCO ₃	2	(mM)
Na ₂ C ₂ O ₄	0.1	(mM)
Na ₂ SO ₄	9	(mM)
NaH ₂ PO ₄	3.6	(mM)
Na ₂ HPO ₄	0.4	(mM)

Pentru detectarea viabilității tulpinilor cu ajutorul CF, s-au selectat inițial **fluorocromii** care pot indica diferențe privind integritatea membranei celulare sau potențialul membranelor. Pentru evaluarea integrității membranelor a fost utilizată **iodura de propidiu (PI)**, care poate pătrunde numai în celulele cu membrană citoplasmatică permeabilizată, în timp ce potențialul membranelor a fost evaluat prin utilizarea **DiBAC₄(3)** sau bis-oxonol (BOX), o moleculă hidrofobă, încărcată negativ (Müller și Nebe, 2010). Controlul de celule viabile a fost reprezentat de o suspensie bacteriană de *E. coli* ATCC 25922 preparată în AUM dintr-o cultură solidă de 18-24 de ore obținută pe agar nutritiv cu o densitate de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml corespunzătoare standardului nephelometric 0,5 McFarland. Controlul de celule moarte a fost obținut prin inactivarea termică la 100°C timp de 30 minute a unei suspensii bacteriene de *E. coli* ATCC25922 preparată la fel ca mai sus.

Citirea probelor s-a realizat cu ajutorul unui citometru Accuri C6 plus (Becton Dickinson, Biosciences) în canalul de fluorescență pentru FL3 (filtre 620/30 nm). Pentru analiza populației bacteriene, au fost achiziționate 10000 de evenimente în poarta specifică populației bacteriene. Achiziția și analiza datelor au fost efectuate cu *software*-ul BD Accuri C6 plus și FlowJo (Fig. 1).

Pentru testarea sensibilității la antibiotice cu ajutorul CF în AUM, suspensiile bacteriene preparate din culturi proaspete de 29 de tulpini de *E. coli* uropatogene au fost inoculate în AUM: LM (mediu Luria Broth) (7:5) pentru a obține densitatea celulară finală de 10^5 CFU/ml, valoare prag de pozitivitate pentru o probă de urină contaminată, respectiv pentru diagnosticul de infecție

urinară. Următoarele antibiotice (discuri) au fost adăugate ciprofloxacina (5 µg), cotrimoxazol (25 µg) și nitrofurantoin (50 µg) (Oxoid), într-un volum final de 1 ml. După 4 ore de incubare, probele au fost centrifugate la 7000 rpm timp de 3 minute și resuspendate în 500 µl de soluție sterilă de tampon fosfat salin (PBS). Pentru controlul metodei a fost folosită tulpina de *E. coli* ATCC 21925, sensibilă la cele 3 antibiotice testate. Tulpina bacteriană sensibilă și izolatele clinice au fost prelucrate urmând protocolul descris mai sus, în același timp. Pentru fiecare test s-au folosit controale de celule viabile și celule inactivate termic de *E. coli* ATCC 21925, incubate cu și fără antibiotic. Analiza medianei de fluorescență (MFI) s-a realizat după marcarea cu PI a probelor și a martorilor (concentrație finală de 1 µg/ml PI), după 10 minute de incubare la temperatura camerei, în întuneric (Fig. 2). Pentru validarea rezultatelor s-au efectuat trei experimente independente pentru antibioticul ciprofloxacina, iar valorile MFI pentru toate cele 3 experimente au fost calculate cu deviație standard și au arătat că nu există o diferență semnificativ statistică între cele ele. În fig. 3 sunt prezentate rezultatele pentru cedle 30 de tulpini bacteriene tratate cu ciprofloxacina. Calculul scorului Z pentru fiecare tulpină testată a arătat valori cuprinse între $+2\sigma$: -2σ . Acest lucru confirmă faptul că valorile observate se situează în intervalul -2σ și $+2\sigma$ față de medie, în proporție de 95%. Rezultatele obținute au fost comparate cu cele obținute prin analiza Vitek®2 (bioMérieux) și disc difuzimetrică a tulpinilor testate.

EXEMPLU NR. 2. PROCEDEU DE CITOMETRIE ÎN FLUX PENTRU TESTAREA SENSIBILITĂȚII LA ANTIBIOTICE A TULPINILOR DE *E. COLI* UROPATOGENE ÎN PROBE DE URINĂ DE LA DONATORI SĂNĂTOȘI CONTAMINATE ARTIFICIAL

Pentru testarea sensibilității la antibiotic în probe de urină contaminate artificial s-au utilizat suspensii bacteriene preparate din culturi de 18-24 de ore dezvoltate pe mediu solid (agar nutritiv), care au fost inoculate în probele de urină naturală la o densitate celulară finală de 10^5 UFC/ml, în prezența a diferite concentrații de antibiotice solubilizate în prealabil în mediu LB (Tabelul 2).

Tabelul 2. Concentrațiile de antibiotice selectate pentru testele de determinare a sensibilității la antibiotice prin metoda CF a unor tulpini bacteriene în probe de urină contaminate artificial.

Antibiotic	Abreviere	Concentrație 1	Concentrație 2	Concentrație 3
Nitrofurantoin	F	150 µg/ml	75 µg/ml	18 µg/ml
Ceftriaxonă	CRO	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml

Cotrimoxazol	SXT	100 µg/ml	50 µg/ml	25 µg/ml
Ciprofloxacin	CIP	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml

Controlul negativ de fluorescență care corespunde populației bacteriene nefluorescente a fost reprezentat de suspensia bacteriană preparată în proba de urină și colorată cu fluorocromul DiBAC₄(3). Colorantul nu pătrunde în celulele viabile, cu potențial membranal neafectat. Au fost de asemenea preparate controale negative reprezentate de medii de cultură neinoculate, respectiv 100 µl urină, respectiv 100 µl LB.

Probele de urină inoculate cu diferite tulpini bacteriene uropatogene au fost incubate la întuneric la 37 °C timp de 4 ore și apoi evaluate spectrofotometric la 620 nm. Cea mai scăzută concentrație de antibiotic care a inhibat complet creșterea microbiană confirmată prin citirea spectrofotometrică a fost înregistrată ca valoarea concentrației minime inhibitorii (CMI).

După marcarea cu DiBAC₄(3), la o concentrație finală de 0,5 µg/ml, timp de 30 de minute la 37 °C, la întuneric, atât probele de urină inoculate cu diferite tulpini bacteriene uropatogene, cât și controalele pregătite au fost analizate prin CF (BD Accuri C6 Plus) pentru stabilirea valorilor CMI pentru fiecare antibiotic selectat. Analiza citometrică a evaluat fluorescența verde în canalul de fluorescență FITC (filtre 530/30 nm). Pentru analiza populației bacteriene, au fost achiziționate un total de 10000 de evenimente în poarta corespunzătoare populației bacteriene. Pentru fiecare tulpină au fost analizate, de asemenea, celulele netratate cu antibiotic și necolorate pentru a evalua autofluorescența celulelor native și pentru a defini setările de achiziție. Achiziția și analiza datelor au fost efectuate cu software-ul BD Accuri C6 plus și FlowJo.

Analiza acestor rezultate ne-a permis să stabilim că pentru procente mai mari de 20% de celule depolarizate, tulpinile au fost evaluate ca sensibile, în timp ce pentru procente mai mici de 20% celule depolarizate, au fost evaluate ca rezistente.

Rezultatele obținute prin CF pot fi reprezentate fie sub forma procentului de celule depolarizate, fie sub forma unui indice de marcarea denumit *stain index* (SI) (Fig. 4), ce a fost calculat pentru fiecare concentrație de antibiotic în parte, și a fost definit ca raportul dintre valorile medianei de fluorescență a celulelor bacteriene tratate cu antibiotic și a celulelor netratate. S-a constatat că o valoare a SI mai mare de 2 este asociată tulpinilor sensibile, iar o valoare mai mică de 2 este asociată tulpinilor rezistente.

Analiza comparativă a rezultatelor de CF și a celor obținute prin metodele standard (antibiogramă) a relevat un număr redus de discrepante majore, pentru ceftriaxonă, trimetoprim-sulfametoxazol și ciprofloxacin (Tabelul 3). Valorile sensibilității și specificității metodei CF aplicată probelor de urină de la donatori sănătoși artificial contaminate cu tulpini de *E. coli* uropatogene au fost de 100%/100% pentru nitrofurantoin, de 85,7%/95.6% pentru trimetoprim-sulfametoxazol, de 91,6%/94,1% pentru ceftriaxonă și de 93,7%/ 100% pentru ciprofloxacin.

Sensibilitatea și specificitatea au fost calculate după formulele din Tabelul 3, unde (a=tulpini rezistente, rezultate pozitive; b=rezultate fals-positiv; c=rezultate fals-negative; d=tulpini sensibile, rezultate negative).

Tabelul 3: Compararea rezultatelor obținute prin citometrie în flux cu cele obținute prin metodele standard de determinare a sensibilității la antibiotice

Tulpini	Nitrofurantoin		Trimetoprim-sulfametoxazol		Ceftriaxonă		Ciprofloxacin	
	FC	Standard	FC	Standard	FC	Standard	FC	Standard
<i>E.coli 428</i>	S	S	S	S	S	S	S	R
<i>E.coli 127</i>	S	S	S	S	S	R	R	R
<i>E.coli 956</i>	S	S	R	R	R	R	R	R
<i>E.coli 4493</i>	S	S	S	S	R	R	R	R
<i>E.coli 451</i>	S	S	S	S	R	R	R	R
<i>E.coli 424</i>	S	S	S	S	R	R	R	R
<i>E.coli 547</i>	S	S	S	R	S	S	S	S
<i>E.coli 491</i>	S	S	R	R	R	S	S	S
<i>E.coli 3894</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>E.coli 3830</i>	S	S	R	R	R	R	R	R
<i>E.coli 213</i>	S	S	R	R	S	S	R	R
<i>E.coli 3812</i>	S	S	R	R	S	S	R	R
<i>E.coli 220</i>	S	S	S	S	S	S	R	R
<i>E.coli 253</i>	S	S	S	S	S	S	R	R
<i>E.coli 214</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>E.coli 8426</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>E.coli 130</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>E.coli 429</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>E.coli 3865</i>	S	S	S	S	R	R	R	R
<i>E.coli 27</i>	S	S	S	S	R	R	R	R
<i>E.coli 102</i>	S	S	R	R	R	R	R	R
<i>E.coli 2448</i>	S	S	S	S	R	R	S	S
<i>E.coli 3906</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>E.coli 2498</i>	S	S	S	S	R	R	R	R

<i>E.coli</i> 2416	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>E.coli</i> 218	S	S	S	S	R	R	R	R
<i>E.coli</i> 2432	S	S	R	S	S	S	S	S
<i>E.coli</i> 439	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>E.coli</i> 2415	S	S	S	S	S	S	S	S
Sensibilitate a/(a+c)	100%		85,7%		91,6%		93,7%	
Specificitate d/(b+d)	100%		95,6%		94,1%		100%	
Rezultate fals-pozitive b/(b+d)	0%		4,5%		5,8%		0%	
Rezultate fals-negative c/(a+c)	0%		14,2%		8,3%		6,25%	

EXEMPLUL NR. 3. VALIDAREA METODEI DE DETECȚIE ȘI TESTARE A SENSIBILITĂȚII LA ANTIBIOTICE PRIN CITOMETRIE ÎN FLUX, DIRECT DIN PROBE DE URINĂ CU SEMNIFICAȚIE PATOLOGICĂ

Pentru a valida metoda bazată pe citometria în flux, au fost analizate un total de 117 de probe clinice de urină, prelucrate simultan și prin metodele convenționale de microbiologie clasică, respectiv urocultura și realizarea antibiogramei.

Probelor de urină au fost însămânțate pe mediu geloză-sânge și mediu lactozat (Drigalski sau MacConkey) și incubate timp de 24 ore la 37°C. În cazul uroculturilor pozitive s-au izolat tulpinile de interes și s-a realizat antibiograma pentru cele 4 antibiotice testate.

În 4 tuburi Eppendorf a fost adăugat un volum de 50 μl din fiecare probă de urină supusă examenului microbiologic, peste care s-au adăugat 50 μl soluție de antibiotic de diferite concentrații (nitrofurantoin 150 μg/ml, ceftriaxonă 4 μg/ml, ciprofloxacina 4 μg/ml, cotrimoxazol 100 μg/ml), utilizând ca martori, probe de urină necontaminată, respectiv urină: mediu LB 1:1. Toate probele au fost marcate cu 1 μl DiBAC₍₄₎3 (0,5 μg/ml), urmată de incubare timp de 4 ore, la întuneric, la 37°C; Citirea probelor s-a realizat cu ajutorul unui citometru Accuri C6 plus (Becton Dickinson, Biosciences) în canalul de fluorescență pentru FITC (filtre 530/30 nm). Pentru analiza populației bacteriene, au fost achiziționate 10000 de evenimente în poarta specifică populației bacteriene. Achiziția și analiza datelor au fost efectuate cu *software*-ul BD Accuri C6 plus și FlowJo.

Analiza diagramelor în puncte și histogramelor pe poarta specifică populației bacteriene, a evidențiat faptul că un total de 77 de probe de urină (65,8%) au fost negative (nu s-a detectat populație bacteriană) și 40 pozitive (34,18%) (s-a detectat o populație bacteriană viabilă). Procentul mare de probe negative rezultat în urma cultivării pe medii de cultură demonstrează utilitatea

tehnicii CF ca metodă eficientă și rapidă de *screening* al probelor de urină înainte de cultivarea acestora.

Rezultatele citometrice pot fi reprezentate sub forma histogramelor din care se poate observa dacă se suprapune sau nu peste controlul de celule netratate cu antibiotic (celule viabile). Astfel histogramele probelor de urină pozitive cu tulpinile *E.coli* 2559 și *E.coli* 3616 expuse la antibiotic sunt reprezentate în Fig. 5. Citirea s-a realizat pe canalul de fluorescență FITC-H, histogramele indicând după 4 ore, o fluorescență mărită în cazul tulpinilor sensibile la antibiotic ca urmare a pătrunderii fluorocromului DiBAC(4)3. Tulpina *E.coli* 2559 a înregistrat 2 rezultate fals-pozitive pentru nitrofurantoin (150 µg/ml) și trimetoprim-sulfametoxazol (100 µg/ml) acestea prezentând o fluorescență scăzută, asemănătoare cu controlul de celule viabile netratate cu antibiotic. Prin metoda standard aceasta tulpină a fost evaluată ca sensibilă la cele 2 antibiotice, pe când prin CF a fost clasificată ca rezistentă. Rezultatul obținut poate fi consecința unui timp scurt de incubare în prezența antibioticului (4 ore comparativ cu 24 de ore). În ceea ce privește ceftriaxona și ciprofloxacina, date obținute prin citometrie au coincis cu cele din antibiogramă.

Tulpina de *E.coli* 3616 a prezentat un nivel ridicat al fluorescenței pentru toate antibioticele testate, aceasta fiind evaluată ca sensibilă și prin metoda standard. Deși pentru nitrofurantoin și trimetoprim-sulfametoxazol se observă un procent al celulelor depolarizate scăzut (26,2%, respectiv 33,6%) comparativ cu ceftriaxona (77,4%) și ciprofloxacina (65%), tulpina a fost totuși considerată sensibilă, intensitatea fluorescenței depășind pragul de 20% celule depolarizate. Probabil, antibioticele nitrofurantoin și trimetoprim-sulfametoxazol necesită un timp mai îndelungat de incubare pentru a distruge celulele bacteriene, antibiograma oferind rezultatele corecte în 24 ore.

EXEMPLUL 4. CALCULAREA PARAMETRILOR DE PERFORMANȚĂ AI CITOMETRIEI ÎN FLUX PENTRU ANALIZA PROBELOR DE URINĂ

Analiza comparativă a rezultatelor protocolului de testare a sensibilității la antibiotice bazat pe citometrie în flux direct în probe de urină cu rezultatele metodei de referință, bazate pe cultivare, a relevat valori diferite ale parametrilor de performanță deoarece s-a înregistrat un număr relativ crescut de rezultate fals-pozitive și fals-negative în special pentru nitrofurantoin și trimetoprim-sulfametoxazol. Rezultatele pentru nitrofurantoin în cazul contaminării artificiale a probei de urină provenită de la voluntari sănătoși, au fost 100% sensibilitate și specificitate,

neînregistrându-se niciun rezultat fals-pozitiv. În cazul unei infecții urinare, proba de urină prezintă un pH diferit, fiind mai alcalin, dar și numeroase cristale și diferite celule (leucocite, hematii, etc) comparativ cu o proba de urină provenită de la voluntari sănătoși, deci cauza posibilă pentru rezultatele false, poate fi explicată fie de faptul că nitrofurantoinul este un antibiotic bacteriostatic și necesită un tratament mai îndelungat pentru a elimina infecția, fie de reacția lui cu pH-ul urinei care este alcalin în cazul unei infecții urinare. Valorile specificității și sensibilității metodei în funcție de antibioticul testat au fost 90,1% / 62% pentru nitrofurantoin, 84,2% / 57,1% pentru trimetoprim-sulfametoxazol, de 75% / 92,8% pentru ceftriaxonă și 94,1% / 78,2% pentru ciprofloxacin (Fig. 6).

REVENDICARE

1. Protocol de citometrie în flux care să permită discriminare rapidă a probelor de urină pozitive microbiologic, precum și determinarea profilului de sensibilitate la antibioticele utilizate în schemele de terapie de urgență a infecțiilor de tract urinar, facilitând îmbunătățirea tratamentului empiric cu antibiotice.
2. Protocolul rapid propus în această cerere de brevet scurtează timpul de procesare a probelor de urină cu 24-48 ore în cazurile de infecție monomicrobiană, comparativ cu metodele clasice de identificare și de testare a sensibilității la antibiotice, facilitând instituirea unui tratament empiric adecvat.
3. Procedeu poate oferi informații precise și rapide pentru probele de urină negative, înainte de cultivarea acestora, crescând astfel eficacitatea laboratorului clinic de rutină din punct de vedere economic, prin reducerea costurilor medilor de cultură.
4. Protocolul de citometrie în flux propus în acest brevet reprezintă o abordare convenabilă, rapidă și fiabilă (sensibilitate și specificitate de 100%) pentru detectarea rapidă a populației bacteriene și pentru testarea sensibilității la antibiotice a tulpinilor de *E.coli* direct în probele de urină.

FIGURI

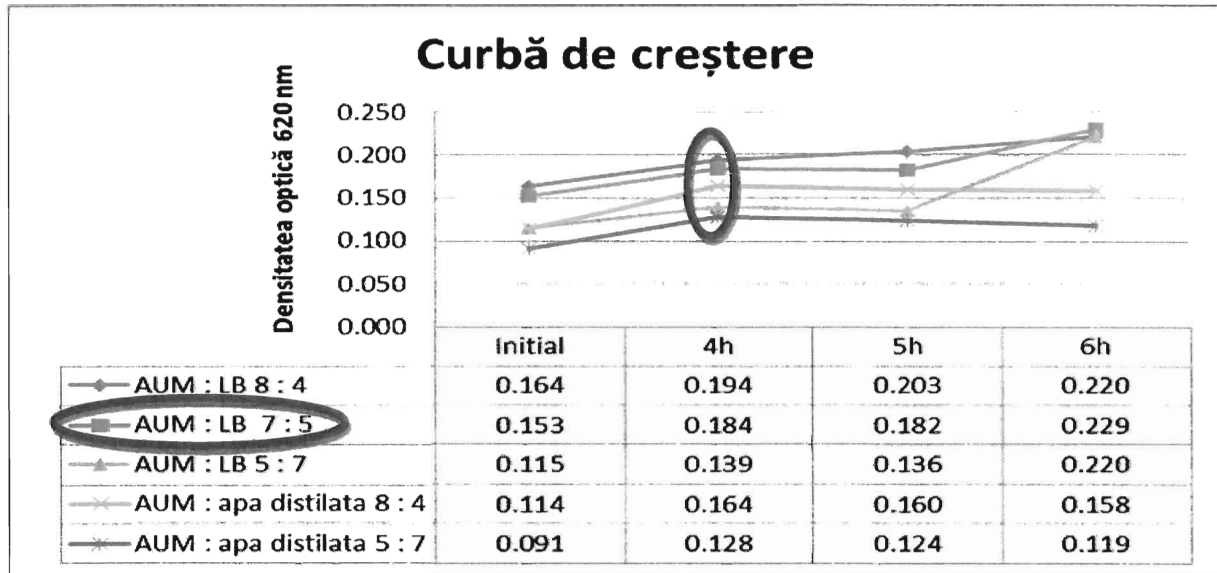


Fig. 1. Curbă de creștere pentru identificarea timpului minim de incubare - reprezentarea grafică a densității optice care indică timpul minim de incubare pentru a obține creștere bacteriană și varianta experimentală optima selectată.

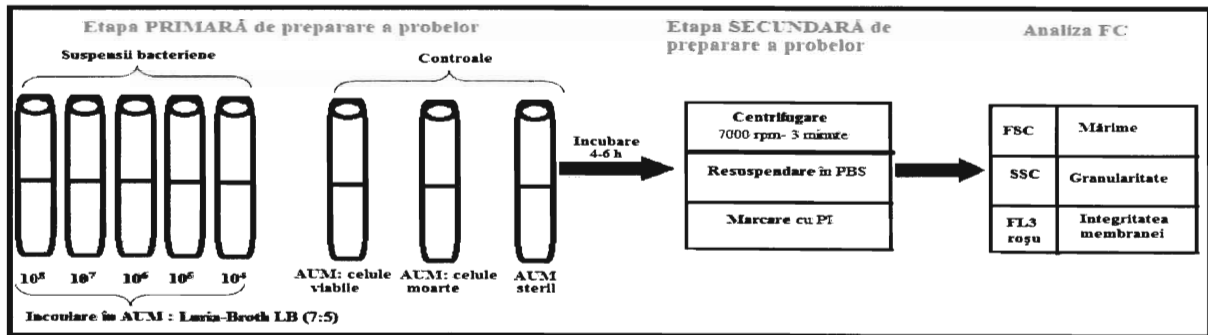


Fig. 2. Schema de lucru pentru prepararea probelor cu scopul de a valida protocolul de detectare a viabilității tulpinilor analizate.

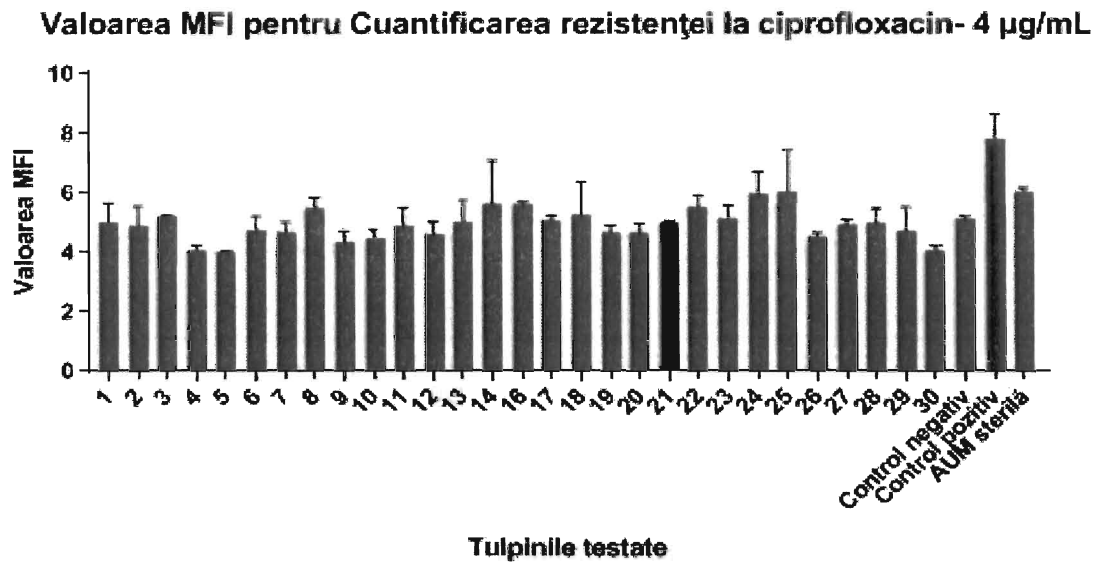


Fig. 3. Cuantificarea valorilor MFI obținute prin 3 experimente independente folosind 30 tulpini de *E.coli* 1-30, expuse tratamentului cu ciprofloxacina.

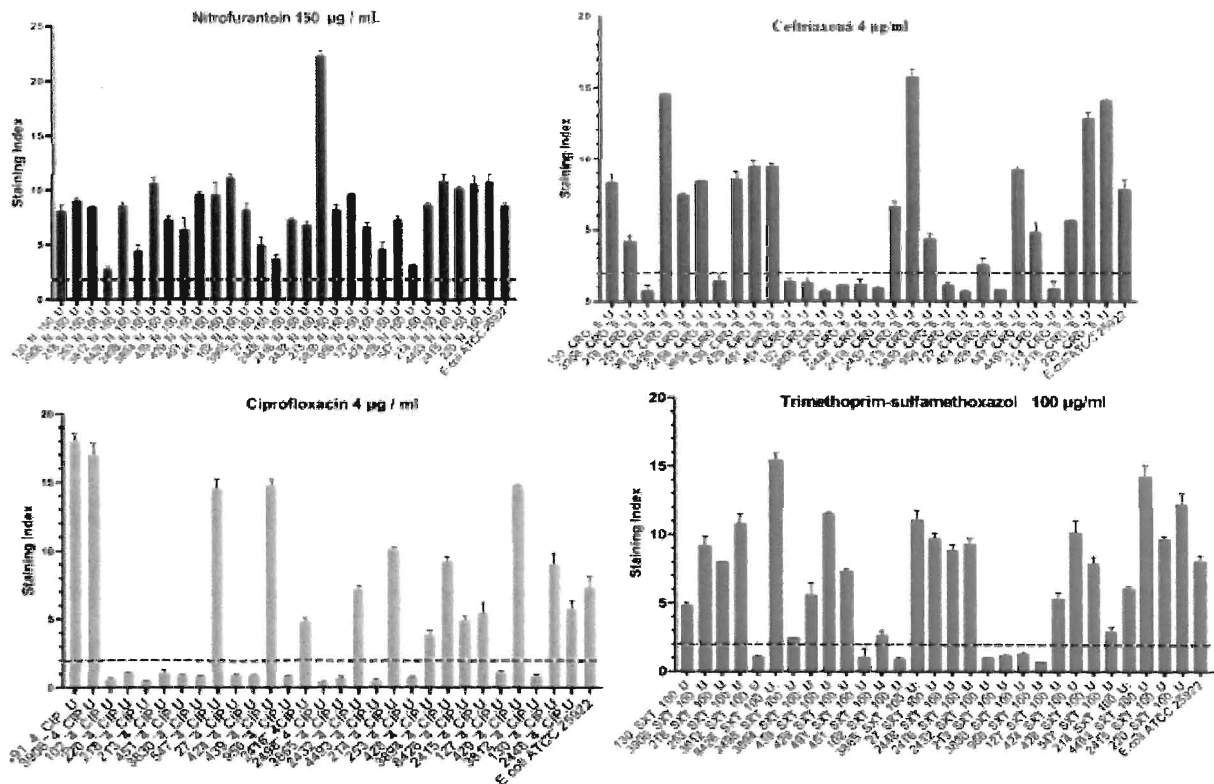


Fig. 4. Reprezentarea grafică a raportului dintre intensitatea fluorescenței celulelor tratate cu nitrofurantoin (150 µg/ml), ceftriaxonă (4 µg/ml), ciprofloxacin (4 µg/ml), trimetropim-sulfametoxazol (100 µg/ml) și celulele netratate cu antibiotic- *Stain index* (SI).

45

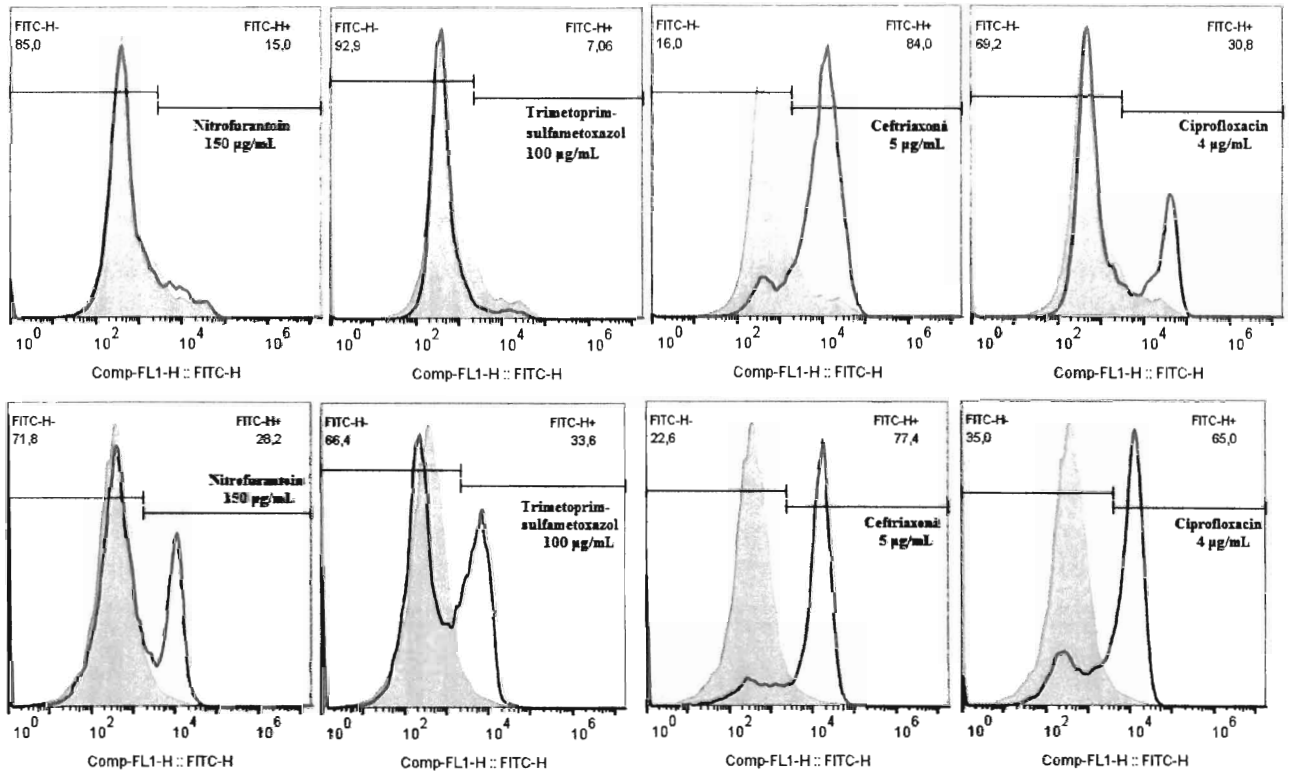


Fig. 5. Distribuția fluorescenței pentru tulpinile de *E.coli* 2559 și *E. coli* 3616 tratate cu antibiotice la diferite concentrații. Conturul negru indică controlul pozitiv (tulpina netratată cu antibiotic), iar conturul albastru indică populația bacteriană expusă la antibiotic.

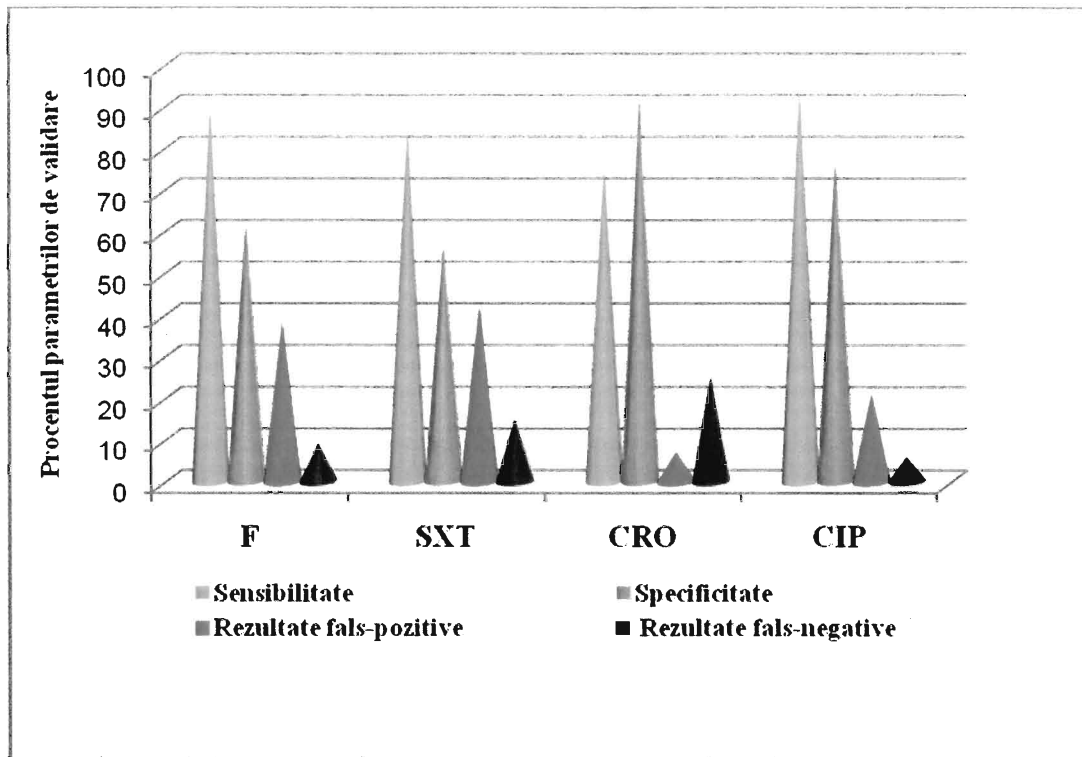


Fig. 6. Reprezentarea grafică a procentului parametrilor de performanță obținuți pentru analiza prin CF a probelor de urină.