

Microcalorimetria – metodă nouă de caracterizare bacteriană

Dragoș C. Zaharia¹,
Mihnea G. Popa¹,
Alexandru T.
Steriade¹, Alexandru
A. Muntean^{1,2},
Octavian Balint¹,
Roxana Micuș¹,
Vlad T. Popa²,
Mircea I. Popa¹,
Miron A. Bogdan¹

¹. Universitatea de Medicină și
Farmacie „Carol Davila”, București

². Academia Română,
Institutul de Chimie-Fizică
„Ilie Murgulescu”, București

Contact:
Dr. Dragoș-Cosmin Zaharia
Medic specialist pneumolog,
Institutul Național de Pneumologie
„Marius Nasta”, București
Asistent universitar Universitatea
de Medicină și Farmacie
„Carol Davila”, București
e-mail: zahariadragoscosmin@gmail.com

Abstract

Microcalorimetry – a new method for bacterial characterisation

The microcalorimetry is a method used for recording of the heat produced by a thermodynamic system in a scale of micro-nanojoules. One of the domains in which this method is used is the one called bacterial microcalorimetry, which studies the heat generated by the bacterial populations. The process of bacterial growth can be monitored in real time by the recording a graph of the generated power over time. The modern isothermal microcalorimeters allow the detection of a signal variation of only one microwatt. The estimated generated power of a bacteria is approximately 1-4 pW, thus only a small number of bacteria is necessary for the experiments. Recent studies in the field of bacterial microcalorimetry have demonstrated that, in standard conditions, this method can be reproducible and can be used to detect and characterize bacterial growth (through the study of the microcalorimetric growth curve particular to a bacterial species which is called a microcalorimetric fingerprint) and offers the possibility of obtaining new information in regards to bacterial metabolism. Also, microcalorimetry can offer information about bacterial interaction with different factors in the medium (for example, antibiotic substances, in which case an antibiogram is obtained in 4-5 hours). In conclusion, we can say that microcalorimetry is a reproducible method, which offers an interesting perspective on bacterial characterization, with great scientific potential, and there are sufficient arguments to continue studies in this field.

Keywords: bacterial population, bacterial culture, microcalorimetry

Rezumat

Microcalorimetria este o metodă de înregistrare a căldurii degajate de un sistem termodinamic cu ordine de mărime de măsura micro-nanojoulilor. Unul din domeniile de utilizare este cel numit microcalorimetrie bacteriană, ce studiază căldura degajată de populații bacteriene. Procesul de creștere a unei culturi bacteriene poate fi monitorizat în timp real prin înregistrarea sub forma unui grafic a evoluției puterii dezvoltate (W) în funcție de timp. Microcalorimetrele izoterme moderne permit detecția unei variațiuni a semnalului de ordinul unui μ W. Puterea dezvoltată de o bacterie este estimată la 1-4 pW, fiind deci necesar un număr mic de bacterii pentru experimente. Studiile recente în domeniul microcalorimetriei bacteriene au demonstrat că, în condiții standardizate, această metodă poate fi reproductibilă și poate fi folosită pentru detecție și caracterizare bacteriană (studiul curbei microcalorimetrice particulare a unei specii bacteriene numit și „amprenta microcalorimetrică”) și oferă posibilitatea obținerii unor informații noi în ceea ce privește metabolismul bacterian. De asemenea, această metodă poate aduce într-un timp scurt informații despre interacțiunea populației bacteriene cu diferiți factori din mediu (de exemplu, substanțe cu efect antibiotic, în acest caz obținându-se o antibiogramă în aproximativ 4-5 ore). În concluzie, putem spune că microcalorimetria este o metodă reproductibilă, ce oferă o perspectivă interesantă de caracterizare bacteriană, cu un mare potențial științific și că există multe dovezi ce argumentează continuarea cercetărilor în acest domeniu.

Cuvinte-cheie: populație bacteriană, cultură bacteriană, microcalorimetrie

Introducere

Microcalorimetria este o metodă de înregistrare a căldurii degajate de un sistem termodinamic cu ordine de mărime de măsura micro-nanojoulilor (μ J, nJ). Cu ajutorul microcalorimetriei se poate studia comportamentul termic al unor populații bacteriene, studiind culturi pe mediu lichid (așa-numita microcalorimetrie bacteriană). Acest lucru este posibil deoarece bacteriile, datorită metabolismului lor activ ce cuprinde reacții biochimice exoterme, degajă căldură. Se estimează că puterea dezvoltată de o bacterie este de aproximativ 1-3 picowatts (pW)¹, fiind necesar ca proba să conțină doar 10^4 - 10^5 bacterii pe mL pentru detecția semnalului. Deși s-au făcut studii de microcalorimetrie bacteriană încă din anii '70, această metodă a parcurs o nouă etapă de cercetare, revenind recent în atenția comunității

științifice pentru potențialul de utilizare în diverse domenii (biologie, științele mediului, medicină), dar și pentru că este una din cele mai sensibile metode de detecție bacteriană. Procesul de creștere a unei populații bacteriene poate fi monitorizat în timp real prin înregistrarea sub forma unui grafic a evoluției puterii dezvoltate (W) în funcție de timp. Microcalorimetrele izoterme moderne permit detecția unei variațiuni a semnalului de ordinul unui μ W. O lucrare recentă a estimat o valoare mai mare a puterii dezvoltate de o bacterie la 1-4 pW, fiind deci necesar un număr chiar mai mic de bacterii, și anume $6,25 \times 10^3$ - $2,5 \times 10^4$ pe mL².

Tehnologie și principii fizice

Tehnica microcalorimetrică are la bază efectul termoelectric (Seebeck) descoperit în anul 1821 de fizicianul ger-

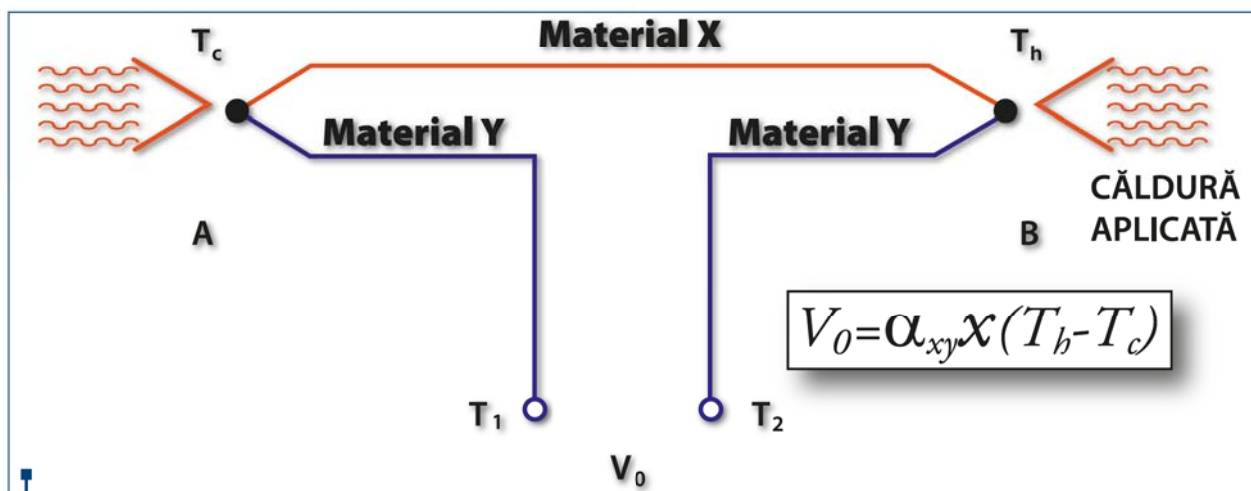


Figura 1. Schemă reprezentând efectul Seebeck. Încălzind jonctiunea B ($T_h > T_c$), la bornele T1-T2 apare o diferență de potențial electric (V_0), numită tensiune Seebeck. α , χ sunt coeficienți specifici celor două metale folosite în montaj

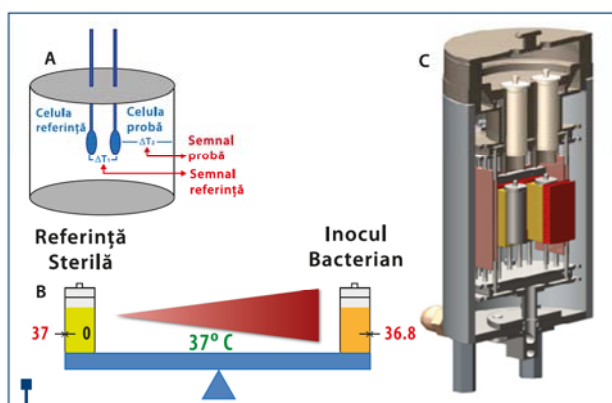


Figura 2. A. Schemă a funcționării microcalorimetrului diferențial. B. Balanța de căldură: la nivelul Referinței, toată căldura provine dintr-o sursă externă (bucla de termostatare a microcalorimetrului), în timp ce în celula-probă, o parte din căldură este degajată de populația bacteriană. C. Secțiune prin blocul microcalorimetric

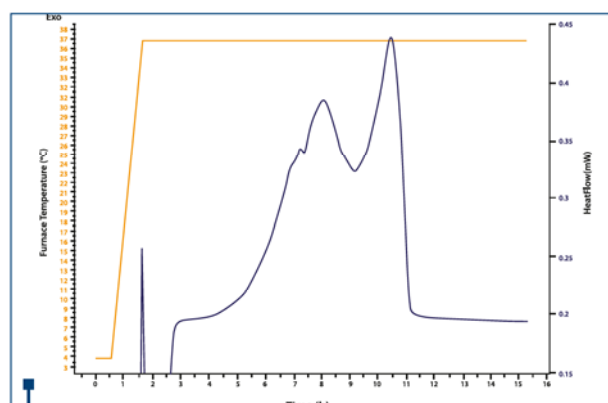


Figura 3. Înregistrare a semnalului microcalorimetric sub forma graficului dependenței fluxului de căldură (HeatFlow – mW) în funcție de timp (h) și temperatura sursei externe (°C)

man Thomas Johann Seebeck. Acest efect presupune dezvoltarea unei diferențe de potențial electric la capetele unor fire metalice care sunt unite, iar jonctiunea acestora este încălzită la o anumită temperatură (acest montaj mai este denumit și termocuplu). Acest principiu se află și la baza funcționării termometrelor cu termocuplu (figura 1).

Pentru a crește sensibilitatea și acuratețea, au fost construite microcalorimetre diferențiale cu două canale, unde fluxul de căldură din celula-probă este comparat cu cel din celula-referință, care în mod ideal are aceeași capacitate și conducție termică ca și proba (figura 2). Diferența de potențial rezultată în urma fluxului de căldură între probă și referință poate fi înregistrată sub forma unui semnal electric și reprezentat grafic sub forma dependenței fluxului de căldură (mW) în funcție de timp (figura 3).

Stadiul actual al cercetărilor în domeniu

În ultimii ani s-au efectuat numeroase cercetări în domeniul microcalorimetriei bacteriene în încercarea de a folosi această metodă pentru studiul comportamentului termic microbial și pentru a utiliza acest comportament atât în practica de laborator, cât și în practica clinică. Multe dintre cercetări s-au concentrat asupra posibilității de identificare bacteriană și asupra obținerii unui spectru de susceptibilitate la substanțe antibiotice pe baza comportamentului microcalorimetric (aspectului și parametrilor graficului înregistrării fluxului de căldură în funcție de timp). S-a observat că diferite specii bacteriene au în anumite condiții experimentale comportament termic diferit, motiv pentru care aspectul particular al curbei de creștere microcalorimetrică a populației bacteriene studiate a fost numit și „amprentă microcalorimetrică”.

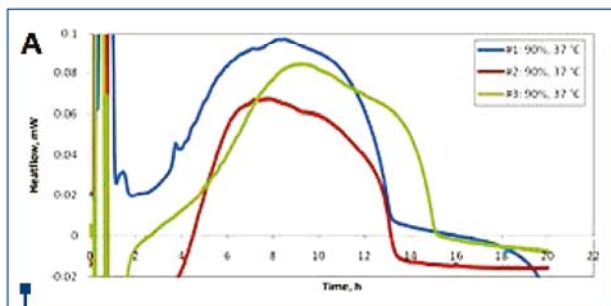


Figura 4.A. Test de reproductibilitate a metodei folosind aceleași condiții experimentale. Probele de cultură pe mediu lichid (TSB) de *Staphylococcus Epidermidis* preparate din inocul de aceeași concentrație (transmitanță T600 ~ 90%) au fost ținute inițial la temperatură scăzută (1-2°C). Problemele de reproductibilitate apar datorită schimbării regimului calorimetric iso – non-iso – isoterm. Curbele microcalorimetrice pot fi prelucrate cu ajutorul unui software special ce permite corecția semnalului pe cele două axe, rezultând superpoziția curbelor

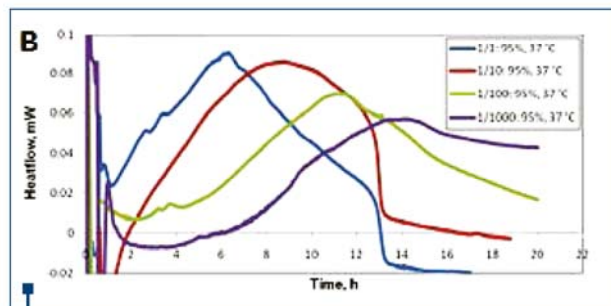


Figura 4.B. Test de variabilitate în funcție de concentrația populației bacteriene, efectuat pe diluții seriate, 1/10, 1/100, 1/1000, de probe cu transmitanță T600 ~ 95% incubate la o temperatură de 37 °C. Semnalele generate de populațiile bacteriene cu diluții crescătoare evidențiază scăderea amplitudinii semnalului și un timp de latență mai lung până la detecția acestuia

Motivul concentrării acestor cercetări asupra acestor subiecte se datorează, probabil, faptului că infecțiile bacteriene reprezintă o problemă majoră de sănătate publică³. Dintre infecții, cele respiratorii se află printre primele locuri ca incidență și prevalență și complică bolile respiratorii cronice, acestea fiind a treia cauză de mortalitate la nivel mondial după boli cardiovasculare, diabet și cancer⁴.

Infecțiile comunitare cu bacterii multirezistente, dar mai ales infecțiile nozocomiale cu germeni rezistenți au o mortalitate mare în primele zile de spitalizare^{5,6}. Rata mare a mortalității este favorizată de folosirea necorespunzătoare a antibioterapiei și de durata relativ lungă până la obținerea unei antibiogramme (24-48 de ore). De aici nevoia de a găsi noi metode cât mai rapide de caracterizare bacteriană (identificare și spectru de susceptibilitate antibiotică).

Studii recente au dovedit că este posibilă obținerea unei antibiogramme rapide și complete în 4-5 ore cu ajutorul microcalorimetriei^{7,8,9,10}.

Pentru acest lucru, este nevoie de un microcalorimetru multicanal (actualmente cu până la 48 de canale ce rulează în paralel, fiind posibilă înregistrarea simultană a 48 de experimente pe 48 de celule-probă ce conțin 48 de concentrații diferite din diverse antibiotice).

Rezultatele unor cercetări privind interacțiunea bacteriană cu diferiți compuși biologici sau chimici au întărit și mai mult argumentele asupra utilizării acestei metode^{11,12,13} în obținerea spectrului de susceptibilitate bacterian.

Au fost efectuate și câteva studii ce au apreciat reproductibilitatea și variabilitatea metodei, evidențiindu-se reproductibilitatea metodei în aceleași condiții experimentale standardizate¹⁴, variațiunea semnalului microcalorimetric în funcție de concentrația bacteriană a populației din celula-probă și de temperatura de lucru (figura 4)^{14,15}, dar și studii ce au evidențiat superioritatea acestei metode în aprecierea în dinamică a dimensiunii populației bacteriene, ce nu poate fi realizată prin metode clasice de numărare¹⁶.

În ceea ce privește identificarea și caracterizarea bacteriană, metoda microcalorimetrică ar putea fi mai rapidă decât metodele clasice microbiologice sau bateriile moderne Analytical Profile Index (API - Biomereux) care pot da rezultate în câteva zile. În principiu, profilele metabolice diferite ale speciilor bacteriene ar trebui să genereze aspecte diferite ale curbelor microcalorimetrice. Analiza tiparelor de creștere termică bacteriană în timp real a evidențiat diferențe semnificative între specii în mai puțin de 8 ore, făcând astfel plauzibilă posibilitatea discriminării între specii bacteriene într-un timp scurt¹⁷.

Pentru o caracterizare mai obiectivă a curbelor microcalorimetrice de creștere bacteriană și pentru o apreciere mai clară a diferențelor de creștere dintre specii, echipa de biocalorimetrie de la Institutul de Chimie-Fizică „Ilie Murgulescu” București a propus o serie de parametri-cheie ai curbei de creștere termică (figura 5 A) ce s-au dovedit a fi utili în diferențierea în maximum 6 ore între o tulpină de *E. Coli* și una de *S. Aureus* (figura 5 B). De asemenea, s-a dovedit că utilizând microcalorimetria se pot face studii asupra metabolismului microbial, contribuind la întregirea cunoștințelor despre populațiile bacteriene¹⁸.

Concluzie

În concluzie, putem spune că microcalorimetria este o metodă reproductibilă, cu un mare potențial științific, și că există multe dovezi științifice ce argumentează continuarea cercetărilor în acest domeniu pentru folosirea microcalorimetriei în studiul populațiilor bacteriene, putând aduce informații rapide în ceea ce privește identificarea bacteriană, profilul metabolic sau spectrul de rezistență/ susceptibilitate la antibiotice.

În încheiere, este de menționat că rolul încă neexplorat al microcalorimetriei poate aduce informații interesante referitoare la profilul vieții bacteriene în condiții extreme (extremofile)^{19,20}. ■

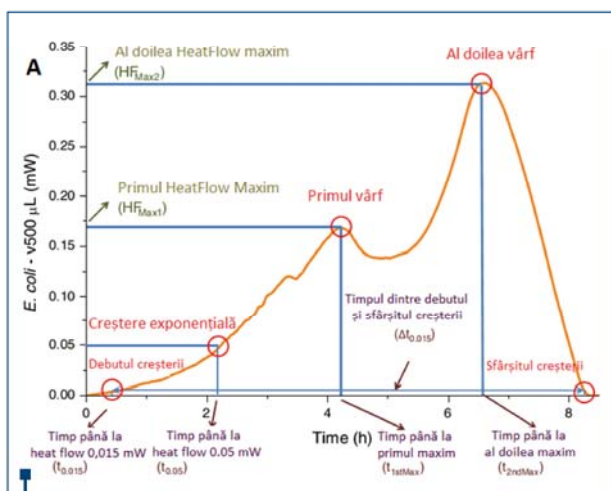


Figura 5.A. Parametrii propuși pentru caracterizarea obiectivă a creșterii termice a populațiilor bacteriene.

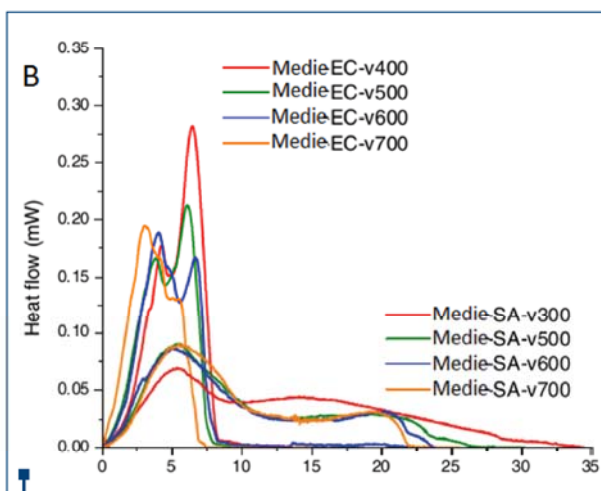


Figura 5.B. „Amprente microcalorimetrice” cu diferențe semnificative a două tulpini bacteriene din specii diferite: *E. coli* și *S. aureus*

Bibliografie

- Braissant O, Wirz D, Göpfert B, Daniels AU. Use of isothermal microcalorimetry to monitor microbial activities. *FEMS Microbiol Lett* 2010, 303:1-8.
- Maskow T, Wolf K, Kunze W, Enders S, Harms H. Rapid analysis of bacterial contamination of tap water using isothermal calorimetry. *Thermochimica Acta* 2012, 543:273-280.
- Polverino E, Dambrava P, Cillóniz C, Balasso V, Marcos MA, Esquinas C, Mensa J, Ewig S, Torres A. Nursing home-acquired pneumonia: a 10 year single-centre experience. *Thorax* 2010, 65(4):354-359.
- World Health Statistics - Mortality and Global Health Estimates - Age-standardized mortality rate by cause. <http://apps.who.int/gho/data/view.main.1400?lang=en>, WHO, 2013.
- Mortensen EM, Restrepo MI, Anzueto A, Pugh JA. Antibiotic Therapy and 48-Hour Mortality for Patients with Pneumonia. *Am J Med*, 119 (10):859-864.
- Kaoutar B, Joly C, L'Héritier F, Barbut F, Robert J, Denis M, Espinasse F, Merrer J, Doit C, Costa Y, Daumal F, Blanchard HS, Eveillard M, Botherel AH, Brückner G, Astagneau P, French Hospital Mortality study group. Nosocomial infections and hospital mortality: a multicentre epidemiology study. *J Hosp Infect* 2004; 58(4):268-275.
- von Ah U, Wirz D, Daniels AU. Rapid Differentiation of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* from Methicillin-Resistant *S. aureus* and MIC Determinations by Isothermal Microcalorimetry. *J Clin Microbiol* 2008, 46(6):2083-2087.
- Baldoni D, Hermann H, Frei R, Trampuz A, Steinhuber A. Performance of Microcalorimetry for Early Detection of Methicillin Resistance in Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2009, 47(3):774-776.
- von Ah U, Wirz D, Daniels AU. Isothermal micro calorimetry: a new method for MIC determinations: results for 12 antibiotics and reference strains of *E. coli* and *S. aureus*. *BMC Microbiol* 2009, 9:106.
- Trampuz A, Steinhuber A, Wittwer M, Leib SL. Rapid diagnosis of experimental meningitis by bacterial heat production in cerebrospinal fluid. *BMC Infect Dis* 2007, 7:116.
- Li X, Zhang Z, Wang C, Zhang T, He K, Deng F. Synthesis, crystal structure and action on *Escherichia coli* by microcalorimetry of copper complexes with 1,10-phenanthroline and amino acid. *J Inorganic Biochemistry* 2011, 105:23-30.
- Kong W, Wang J, Xing X, Jin C, Xiao X, Zhao Y, Zhang P, Zang Q, Li Z. Screening for novel antibacterial agents based on the activities of compounds on metabolism of *Escherichia coli*: A microcalorimetric study. *Journal of Hazardous Materials* 2011, 185:346-352.
- Wang J, Zhao H, Kong W, Jin C, Zhao Y, Qu Y, Xiao X. Microcalorimetric assay on the antimicrobial property of hydroxyanthraquinone derivatives in rhubarb (*Rheum palmatum* L.) to *Bifidobacterium adolescentis*. *Phytomedicine* 2010, 17:684-689.
- Zaharia DC, Iancu C, Steriade AT, Muntean AA, Balint O, Popa VT, Popa MI, Bogdan MA. MicroDSC study of *Staphylococcus epidermidis* growth. *BMC Microbiology* 2010, 10:322.
- Trampuz A, Salzmann S, Antheaume J, Daniels AU. Microcalorimetry: a novel method for detection of microbial contamination in platelet products. *Transfusion* 2007;47(9):1643-1650.
- Braissant O, Wirz D, Göpfert B, Daniels AU. Use of isothermal microcalorimetry to monitor microbial activities. *FEMS Microbiol Lett* 2010, 303:1-8.
- Popa VT. Thermal fingerprints of bacterial growth, CEEC-TAC1 - 1st Central and Eastern European Conference on Thermal Analysis and Calorimetry, 7-10 September 2011, Craiova, Romania.
- Zaharia DC, Muntean AA, Popa MG, Steriade AT, Balint O, Micut R, Iftene C, Tofolean IT, Popa VT, Baicus CM, Bogdan MA. Comparative analysis of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* microcalorimetric growth. *BMC Microbiology* 2013, 13:171 doi:10.1186/1471-2180-13-171.
- Takai K, Nakamura K, Toki T, Tsunogai U, Miyazaki M, Miyazaki J, Hirayama H, Nakagawa S, Nunoura T, and Horikoshi K. Microbiology Cell proliferation at 122°C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 August 5; 105(31): 10949-10954. Published online 2008 July, 29. doi:10.1073/pnas.0712334105PMCID: PMC2490668.
- Mykytczuk NC, Foote SJ, Omelon CR, Southam G, Greer CW, Whyte LG. Bacterial growth at 15 °C: molecular insights from the Permafrost bacterium *Planococcus halocryophilus* Or1. *ISME J*. 2013 Jun;7(6):1211-26. doi:10.1038/ismej.2013.8. Epub 2013 Feb 7.