



Cytometria przepływowa - nowa era badań mikrobiologicznych w mleczarstwie

Wojciech Juzwa

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Kontakt: wojciech.juzwa@up.poznan.pl

Ocena jakości i bezpieczeństwa mleka koncentruje się głównie na monitorowaniu liczby komórek drobnoustrojów oraz komórek somatycznych (gruczołu mlekowego i leukocytów). Od wielu lat zagadnienie to stanowi jeden z priorytetów przemysłu mleczarskiego. Liczba komórek somatycznych (LKS) jest istotnym wskaźnikiem jakości technologicznej mleka oraz jego przydatności do przetwórstwa, a przede wszystkim odzwierciedla stan zdrowia gruczołu mlekowego krów [12]. Wzrost LKS jest najczęściej efektem odpowiedzi immunologicznej na zakażenie bakteryjne, ale może także wynikać z urazów mechanicznych, termicznych lub chemicznych wymienia [13]. Podwyższona LKS wskazuje na zapalenie gruczołu mlekowego (mastitis), najczęściej w postaci podklinicznej, które stanowi jeden z najpoważniejszych problemów zdrowotnych w hodowli bydła mlecznego na świecie [2, 5]. Komórki somatyczne obecne w mleku obejmują złuszczone komórki nabłonkowe oraz leukocyty zaangażowane w odpowiedź immunologiczną. Ich różnicowanie pozwala na dokładniejszą ocenę stanu zdrowia wymienia, co znalazło odzwierciedlenie w opracowaniu metod jednoczesnego oznaczania LKS oraz oznaczeń różnicowej liczby komórek somatycznych (DSCC – Differential Somatic Cell Count) w indywidualnych próbkach mleka [5]. Parametr DSCC, rekomendowany do stosowania w centralnych laboratoriach badania mleka, określa procentowy udział leukocytów wielojądrzastych (PMN - polymorphonuclear neutrophils), limfocytów i makrofagów. Zmiany proporcji tych komórek w trakcie infekcji umożliwiają wczesne wykrywanie podklinicznego mastitis [24, 11].

Nowoczesne analizy mleka surowego wykonywane są z użyciem zaawansowanych analizatorów, umożliwiających jednoczesne oznaczanie komórek somatycznych i bakteryjnych, m.in. z zastosowaniem mikroskopii fluorescencyjnej lub cytometrii przepływowej (np. Foss BacSomatic™).



Techniki te pozwalają także na określenie DSCC poprzez analizę zmian udziału poszczególnych subpopulacji leukocytów z wykorzystaniem swoistych przeciwciał. Chociaż metody mikroskopowe są względnie proste i ekonomiczne, ograniczona liczba analizowanych komórek oraz subiektywny charakter oceny sprawiają, że ich dokładność i powtarzalność są niższe w porównaniu z metodami opartymi na cytometrii przepływowej [19].

Choć liczba komórek somatycznych pozostaje podstawowym parametrem wykorzystywanym w rutynowej ocenie zdrowia gruczołu mlekowego, jednak jej interpretacja ogranicza się do informacji ilościowej i nie odzwierciedla złożoności procesów immunologicznych zachodzących w obrębie wymienia. Pomimo wprowadzenia różnicowania komórek somatycznych (DSCC), które umożliwia ocenę udziału głównych populacji leukocytów, metody te nadal nie uwzględniają kluczowych aspektów biologicznych, takich jak stan funkcjonalny komórek, ich żywotność czy obecność subpopulacji o odmiennym znaczeniu immunologicznym. W konsekwencji zarówno LKS, jak i DSCC mogą nie być wystarczająco czułe w wykrywaniu wczesnych, podklinicznych zmian zapalnych [22].

Ograniczenia te stanowią istotną przesłankę do poszukiwania metod analitycznych umożliwiających pogłębioną, jakościową ocenę komórek somatycznych mleka. W tym kontekście szczególne znaczenie zyskuje cytometria przepływowa, która pozwala na wieloparametryczną analizę pojedynczych komórek obecnych w mleku, z jednoczesnym różnicowaniem populacji leukocytarnych oraz identyfikacją komórek nabłonkowych gruczołu mlekowego. Technika ta umożliwia analizę bardzo dużej liczby zdarzeń w krótkim czasie, co zapewnia wysoką powtarzalność i obiektywność wyników, a jednocześnie znacząco przewyższa klasyczne metody mikroskopowe pod względem zakresu uzyskiwanej informacji biologicznej [22, 21].

Cytometria przepływowa jest nowoczesną metodą ilościowo-jakościowej analizy komórek, opartą na ich przepływie w strumieniu płynu osłonowego przez strefę pomiarową, gdzie są skanowane wiązką lasera. Uporządkowany ruch pojedynczych komórek umożliwia jednoczesny pomiar rozpraszania światła, dostarczający informacji o ich wielkości i strukturze, oraz emisji fluorescencji pochodzącej z zastosowanych znaczników - barwników fluorescencyjnych, odzwierciedlającej poziom wybranych cech komórkowych [23]. Cytometria przepływowa stanowi zatem tzw. technikę single-cell analysis, która dostarcza informacje o każdej komórce z osobna. Istotną zaletą tej techniki jest nie tylko wykrywanie cech komórkowych, lecz także pomiar natężenia z jakim dana cecha występuje w komórce, co umożliwia charakterystykę stanów pośrednich komórek. Dzięki temu cytometria przepływowa pozwala m.in. na identyfikację komórek drobnoustrojów o obniżonej aktywności metabolicznej, w tym form żywych, lecz niehodowlanych (VBNC – viable but non-culturable cells), istotnych w ocenie skażeń mikrobiologicznych [1].

Istotnym elementem podejścia cytometrycznego jest możliwość zastosowania wielokolorowych paneli przeciwciał monoklonalnych, umożliwiających jednoczesną ocenę ekspresji wielu markerów immunologicznych. Pozwala to na precyzyjne immunofenotypowanie komórek somatycznych mleka, w tym rozróżnianie subpopulacji neutrofili, makrofagów i limfocytów oraz ocenę ich udziału w odpowiedzi zapalnej [22].



Dodatkową przewagą cytometrii przepływowej jest możliwość uwzględnienia żywotności komórek poprzez zastosowanie barwników typu Live/Dead, co pozwala na wykluczenie komórek martwych i fragmentów komórkowych oraz skoncentrowanie analizy na populacjach biologicznie aktywnych [22]. Na tej podstawie zaproponowano parametr live differential cell count (LDCC), który w większym stopniu niż klasyczne LKS lub DSCC odzwierciedla rzeczywistą aktywność układu odpornościowego w gruczole mlekowym [8, 9]. Wykazano bowiem, że zmiany w proporcjach poszczególnych subpopulacji leukocytów, w szczególności wzrost udziału neutrofilii przy jednoczesnym spadku udziału makrofagów i limfocytów, mogą występować na bardzo wczesnym etapie procesu zapalnego, jeszcze przed istotnym wzrostem całkowitej liczby komórek somatycznych [22].

Pomimo że charakterystyka komórek somatycznych w mleku z wykorzystaniem cytometrii przepływowej jest obecnie uznawana za jedną z najbardziej zaawansowanych metod analitycznych, uzyskiwane wyniki mogą być obarczone istotną niepewnością pomiarową [4]. Jej źródłem jest m.in. brak możliwości bezpośredniej weryfikacji zliczanych obiektów. Przy wysokiej LKS dochodzi do zagęszczenia próbki i agregacji komórek, co sprzyja ich błędnej interpretacji jako pojedynczych zdarzeń i może prowadzić do zaniżenia wyników. Z kolei złożona matryca mleka surowego sprzyja niespecyficznemu wiązaniu barwników fluorescencyjnych, generując tło sygnałowe, które może zawyżać odczyty LKS i skutkować wynikami fałszywie dodatnimi [17, 3]. Podobne ograniczenia występują w cytometrycznej analizie bakterii w mleku. Niewielkie rozmiary komórek bakteryjnych, ich zdolność do tworzenia agregatów oraz ograniczona rozdzielczość klasycznych cytometrów utrudniają jednoznaczną identyfikację pojedynczych komórek. Konwencjonalne cytometry przepływowe z fotopowielaczami (PMT – photomultiplier tubes), mierzące rozproszenie i fluorescencję światła, mają ograniczoną zdolność rozróżniania pojedynczych komórek od dubletów czy agregatów na podstawie geometrii sygnału. W klasycznym cytometrze parametry komórkowe określa się analizując zależność między polem powierzchni impulsu (wielkość komórki), jego wysokością (intensywność sygnału) i szerokością (czas przebywania komórki w wiązce laserowej). Błędy powstają, gdy agregaty ustawione liniowo lub współpłaszczyznowo „imitują” pojedyncze komórki, co szczególnie dotyczy bakterii tworzących skupiska o zmiennej wielkości i kształcie [15, 10]. Dodatkowo sygnały pochodzące od bakterii często nakładają się na szum aparatu i drobne frakcje zanieczyszczeń (debris), co zwiększa ryzyko błędnej klasyfikacji zdarzeń [16].

Rozwój cytometrii przepływowej w analizie mleka stworzył jednocześnie podstawy do implementacji technik cytometrii obrazowej (imaging flow cytometry - IFC), które łączą zalety klasycznej analizy cytometrycznej z oceną cech morfologicznych komórek. Cytometria obrazowa stanowi unikatowe połączenie cytometru przepływowego i mikroskopu fluorescencyjnego. Precyzyjny układ ciśnieniowo-cieczowy zapewnia stabilny przepływ badanych obiektów przez punkt obserwacyjny z kolejno ustawionymi wiązkami laserów oraz źródłem jasnego pola widzenia.



Kolejno światło przechodzące, rozproszone oraz emitowana fluorescencja są zbierane przez obiektyw mikroskopowy, a następnie światło fluorescencyjne jest rozdzielane na sześć obrazów w ściśle określonych zakresach długości fali za pomocą zestawu filtrów dichroicznych. Uzyskane sygnały są następnie kierowane na powierzchnię wielokanałowej kamery CCD (charge-coupled device) pracującej w trybie integracji z opóźnieniem czasowym (TDI, time delay integration). Tryb ten umożliwia rejestrację do 12 obrazów każdego z obiektów w obrębie wielotysięcznych populacji, z bardzo wysoką jakością oraz wyjątkową czułością fotoniczną. W trybie TDI ładunek generowany przez padające fotony jest przesuwany wzdłuż kolejnych rzędów pikseli w ścisłej synchronizacji z ruchem komórki, co pozwala na wydłużenie czasu integracji sygnału świetlnego. Efekt ten jest analogiczny do fizycznego „podążania” kamerą za obserwowanym obiektem. Następnie sygnał z każdego rzędu pikseli jest odczytywany z dolnej części detektora i wykorzystywany do rekonstrukcji obrazu komórki, który poddawany jest dalszej analizie z użyciem specjalistycznego oprogramowania do analizy obrazu [3, 18, 21].

Unikatową cechą instrumentów jest możliwość zapisu obrazów analizowanych obiektów oraz ich dalszego wykorzystania w zaawansowanej analizie ilościowej. Każda komórka opisywana jest zestawem kilkudziesięciu parametrów podstawowych, obejmujących m.in. intensywność i rozmieszczenie sygnału fluorescencyjnego, cechy morfologiczne, teksturę oraz powierzchnię komórki. Analiza ta może być prowadzona niezależnie dla wszystkich rejestrowanych kanałów detekcji, z zastosowaniem masek definiujących określone obszary obrazu i umożliwiających ocenę wybranych struktur komórkowych. Maski te, tworzone z wykorzystaniem zasad algebry Boole’a (Boolean Logic) oraz algorytmów zdefiniowanych przez użytkownika, pozwalają na precyzyjne wydzielanie regionów zainteresowania i ekstrakcję danych ilościowych [20]. W efekcie możliwe jest wygenerowanie ponad 1000 parametrów opisujących każdą komórkę w obrębie dużych populacji, co w połączeniu z zaawansowanymi metodami analizy danych, w tym narzędziami opartymi na sztucznej inteligencji, czyni cytometrię obrazową jednym z najbardziej wszechstronnych narzędzi współczesnej analizy komórek i cząstek biologicznych [21].

Cytometry przepływowe z bioobrazowaniem (IFC – imaging flow cytometry) pomagają zatem przezwyciężyć niedoskonałości urządzeń konwencjonalnych (konwencjonalnych cytometrów przepływowych), łącząc w jednym systemie statystyczną siłę cytometrii przepływowej z rozdzielczością optyczną mikroskopu [26]. Podejście to umożliwia jednoczesną analizę parametrów ilościowych, fenotypowych i strukturalnych, a w połączeniu z metodami automatycznej analizy obrazu oraz algorytmami uczenia maszynowego otwiera nowe możliwości w zakresie obiektywnej klasyfikacji komórek somatycznych mleka. W tym ujęciu IFC stanowi naturalne rozszerzenie klasycznej cytometrii przepływowej, wpisując się w koncepcję precyzyjnej diagnostyki mastitis oraz zaawansowanego monitorowania zdrowia stad mlecznych. Z kolei w diagnostyce skażeń mikrobiologicznych w mleku oraz na liniach technologicznych zakładów produkcyjnych cytometria przepływowa, a w szczególności cytometria obrazowa jest w stanie zobrazować pełną złożoność i różnorodność populacji mikroorganizmów, włącznie z precyzyjną kontrolą skażeń mikroorganizmami niepożądanymi i/lub patogennymi [6].



Zastosowanie tego narzędzia ma umożliwić nie tylko wczesne wykrywanie skażeń mikrobiologicznych, lecz także istotne zwiększenie potencjału analitycznego poprzez ocenę złożoności funkcjonalnej i strukturalnej drobnoustrojów występujących w postaci agregatów komórkowych. Celem nie jest wyłącznie podniesienie dokładności oznaczeń poziomu skażenia linii technologicznych i produktów, ale również lepsze poznanie właściwości mikroorganizmów tworzących złożone struktury komórkowe. Takie formy organizacji, powszechnie spotykane w środowisku przemysłowym, charakteryzują się zwiększoną odpornością na czynniki zewnętrzne, w tym standardowe procedury mycia i dezynfekcji, co nadaje ich analizie szczególne znaczenie w kontekście bezpieczeństwa i jakości w przemyśle spożywczym [14].

Podsumowując, klasyczne podejście do monitorowania jakości mleka w postaci oznaczania liczby komórek somatycznych, mimo szerokiego zastosowania, dostarcza jedynie informacji ilościowej i nie oddaje złożoności procesów immunologicznych zachodzących w przebiegu mastitis, zwłaszcza w stadium podklinicznym. Wprowadzenie parametrów różnicowych, takich jak DSCC czy LDCC, oraz rozwój cytometrii przepływowej umożliwiły bardziej szczegółową, wieloparametryczną analizę pojedynczych komórek, obejmującą ich fenotyp, żywotność i stany funkcjonalne. Cytometria obrazowa stanowi znaczące udoskonalenie technik cytometrycznych, łącząc zalety konwencjonalnej cytometrii przepływowej i mikroskopii. Dzięki generowaniu setek parametrów opisujących pojedyncze komórki oraz zastosowaniu nowoczesnych metod analizy danych, w tym algorytmów sztucznej inteligencji, technika ta otwiera nowe możliwości w precyzyjnej diagnostyce mastitis oraz monitorowaniu skażeń mikrobiologicznych. Metody cytometryczne, a w szczególności cytometria obrazowa ma zatem potencjał stać się jednym z kluczowych narzędzi diagnostycznych w sektorze mleczarskim. Dynamiczny postęp technologiczny w tym obszarze, połączony z rosnącymi możliwościami zaawansowanej analizy danych, predysponuje tę technikę do coraz szerszego zastosowania w precyzyjnym monitorowaniu zdrowia stad mlecznych oraz w kompleksowej ocenie bezpieczeństwa i jakości surowców oraz produktów mleczarskich.

Literatura

1. Azeredo J., Azevedo N.F., Briandet R., Cerca N., Coenye T., Costa A.R., Desvaux M., Di Bonaventura G., Hébraud M., Jaglic Z., Kačániová M., Knøchel S., Lourenço A., Mergulhão F., Meyer R.L., Nychas G., Simões M., Tresse O., Sternberg C. (2017) Critical review on biofilm methods. Crit. Rev. Microbiol. 43(3): 313–351.
2. Azooz M.F., El-Wakeel S.A., Yousef H.M. (2020) Financial and economic analyses of the impact of cattle mastitis on the profitability of Egyptian dairy farms. Vet. World. 13(8): 1750–1759.
3. Barteneva N.S., Vorobjev I.A. (eds.) (2016) Imaging Flow Cytometry: Methods and Protocols. Methods Mol. Biol. Vol. 1389. Springer, New York.
4. Chakraborty S., Dhama K., Tiwari R., Yatoo M.I., Khurana S.K., Khandia R., Munjal A., Munuswamy P., Kumar M.A., Singh M., Singh R., Gupta V.K., Chaicumpa W. (2019) Technological interventions and advances in the diagnosis of intramammary infections in animals with emphasis on bovine population—a review. Vet. Q. 39(1): 76–94.



5. Cobirka M., Tancin V., Slama P. (2020) Epidemiology and classification of mastitis. *Animals (Basel)*. 10(12): 2212.
6. Comas-Riu J., Rius N. (2009) Flow cytometry applications in the food industry. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36(8): 999–1011.
7. Damm M., Holm C., Blaabjerg M., Bro M.N., Schwarz D. (2017) Differential somatic cell count—A novel method for routine mastitis screening in the frame of Dairy Herd Improvement testing programs. *J. Dairy Sci.* 100(6): 4926–4940.
8. Farschtschi S., Hildebrandt A., Mattes M., Kirchner B., Pfaffl M.W. (2022) Using High-Resolution Differential Cell Counts (HRDCCs) in bovine milk and blood to monitor the immune status over the entire lactation period. *Animals (Basel)*. 12(11): 1339.
9. Farschtschi S., Mattes M., Hildebrandt A., Chiang D., Kirchner B., Kliem H., Pfaffl M.W. (2021) Development of an advanced flow cytometry based high-resolution immunophenotyping method to benchmark early immune response in dairy cows. *Sci. Rep.* 11: 22896.
10. Guilhen C., Forestier C., Balestrino D. (2017) Biofilm dispersal: multiple elaborate strategies for dissemination of bacteria with unique properties. *Mol. Microbiol.* 105(2): 188–210.
11. Halasa T., Kirkeby C. (2020) Differential somatic cell count: value for udder health management. *Front. Vet. Sci.* 7: 609055.
12. Hamann J. (2010) Mastitis and raw milk quality, safety and yield. In: *Improving the Safety and Quality of Milk*. Vol. 1: 246–263. Woodhead Publishing.
13. Kogut M., Schuberth H.J., Sun D., Zigo F., Vasil M., Ondrašovičová S., Ondrašovičová O., Výrostková J., Bujok J., Pecka-Kielb E. (2021) Maintaining optimal mammary gland health and prevention of mastitis. *Front. Vet. Sci.* 8: 607311.
14. Konieczny M., Rhein P., Czaczyk K., Białas W., Juzwa W. (2021) Imaging flow cytometry to study biofilm-associated microbial aggregates. *Molecules*. 26(23): 7096.
15. Kudernatsch R.F., Letsch A., Stachelscheid H., Volk H.D., Scheibenbogen C. (2013) Doublets pretending to be CD34+ T cells despite doublet exclusion. *Cytometry A*. 83A(2): 173–176.
16. McEvoy B., Lynch M., Rowan N.J. (2021) Opportunities for the application of real-time bacterial cell analysis using flow cytometry for the advancement of sterilization microbiology. *J. Appl. Microbiol.* 130(6): 1794–1812.
17. McKinnon K.M. (2018) Flow cytometry: an overview. *Curr. Protoc. Immunol.* 120: 5.1.1–5.1.11.
18. Ortyn W.E., Hall B.E., George T.C., Frost K., Basiji D.A., Perry D.J., Zimmerman C.A., Coder D., Morrissey P.J. (2006) Sensitivity measurement and compensation in spectral imaging. *Cytometry A*. 69A(8): 852–862.
19. Pilla R., Malvisi M., Snel G., Schwarz D., König S., Czerny C., Piccinini R. (2013) Differential cell count as an alternative method to diagnose dairy cow mastitis. *J. Dairy Sci.* 96(3): 1653–1660.



20. Pugsley H.R. (2017) Quantifying autophagy: measuring LC3 puncta and autolysosome formation in cells using multispectral imaging flow cytometry. *Methods*. 112: 147–156.
21. Rees P., Summers H.D., Filby A., Carpenter A.E., Doan M. (2022) Imaging flow cytometry: a primer. *Nat. Rev. Methods Primers*. 2: 86.
22. Scata M.C., Francesco F., Matteis G. (2024) Assessment of flow cytometric tools to characterize milk somatic cells in water buffalo. *J. Dairy Res.* 92(1): 69–72.
23. Shapiro H.M. (2003) *Practical Flow Cytometry*. Fourth Edition. John Wiley & Sons, Hoboken.
24. Sordillo L.M., Shafer-Weaver K., DeRosa D. (1997) Immunobiology of the mammary gland. *J. Dairy Sci.* 80(8): 1851–1865.
25. Widmer J., Descloux L., Brügger C., Jäger M.L., Berger T., Egger L. (2022) Direct labeling of milk cells without centrifugation for counting total and differential somatic cells using flow cytometry. *J. Dairy Sci.* 105(10): 8705–8717.
26. Zuba-Surma E.K., Ratajczak M.Z. (2011) Analytical capabilities of the ImageStream cytometer. *Methods Cell Biol.* 102: 207–230.