

ПЕРСПЕКТИВА ПРИМЕНЕНИЯ КОГЕРЕНТНО-ОПТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ХЛАМИДИОЗА

ФИЛОНОВА Надежда Николаевна, СарНИВИ – филиал ФГБНУ ФИЦВиМ

УЛЬЯНОВА Онега Владимировна, СарНИВИ – филиал ФГБНУ ФИЦВиМ

СУББОТИНА Ирина Анатольевна, СарНИВИ – филиал ФГБНУ ФИЦВиМ

ЗАЙЦЕВ Сергей Сергеевич, СарНИВИ – филиал ФГБНУ ФИЦВиМ

САЛТЫКОВ Юрий Владимирович, СарНИВИ – филиал ФГБНУ ФИЦВиМ

УЛЬЯНОВ Сергей Сергеевич, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского

ЛАРИОНОВА Ольга Сергеевна, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

МОИСЕЕВА Юлия Михайловна, Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского

ФЕДОРОВА Валентина Анатольевна, СарНИВИ – филиал ФГБНУ ФИЦВиМ

51

*В статье рассмотрена возможность применения сканирующего спекл-микроскопа для быстрого 2D сканирования клинических образцов, содержащих хламидии. Современные методы лабораторной диагностики хламидиоза не подтверждают наличие жизнеспособного возбудителя на ранних этапах развития инфекции. Применение когерентно-оптических методов позволяет автоматически обнаруживать даже единичные клетки *S. trachomatis* практически в любых образцах.*

Введение. Диагностика инфекционных заболеваний животных и человека является одной из первостепенных задач специалистов мировых и отечественных служб ветеринарии и здравоохранения. Это связано с необходимостью постоянного мониторинга за распространением инфекционных заболеваний, идентификацией возбудителя и подтверждением нозологического агента в виду его выраженной способности к мутациям.

Несмотря на существование современных молекулярно-генетических и иммунологических методов диагностики инфекционных заболеваний (ПЦР, ПИФ, ИФА), они имеют ряд недостатков: высокая стоимость анализа, выявление лишь генетического материала возбудителя, что может указывать на ранее перенесенное заболевание, длительность проведения исследования [6]. Поэтому необходимо создавать совершенно новое приборное обеспечение для диагностики зооантропонозных инфекций.

В настоящее время все большую популярность среди методов молекулярной биотехнологии приобретают когерентно-оптические методы, которые уже успешно используются во многих областях науки и медицины [5]. Основным преимуществом метода является возможность визуализации внутриклеточ-

ного объекта в виде характерных спеклов. Данный метод позволяет с помощью определенной длины волны проникать сквозь клеточную стенку, не разрушая ее, тем самым неинвазивно детектировать внутриклеточный патоген [3].

Среди внутриклеточных патогенов особое место отводится возбудителю хламидиоза. Его детекция затруднена из-за особенностей цикла развития [1, 2]. Это связано с неспособностью патогена расти на твердых и жидких питательных средах и наличием его в клинических образцах в относительно небольшой концентрации, зачастую за пределами разрешающей способности современных молекулярно-генетических и иммунологических методов.

Для культивирования хламидий обычно применяют методики выращивания на куриных эмбрионах и в культуре клеток. Однако и в этом случае существуют определенные сложности детекции возбудителя хламидиоза рутинными методами диагностики (бактериоскопия, ПИФ, ПЦР), ввиду его низкой концентрации. Однако в обоих случаях для доказательства наличия в указанных объектах жизнеспособных возбудителей необходимым этапом является дезинтеграция клеток соответствующей перевиваемой линии





или эмбриональной ткани с целью идентификации микроорганизма методами бактериоскопии, ПИФ, ПЦР и т.д.

В связи с вышеизложенным цель данной работы – подбор альтернативных вариантов, пригодных для детекции жизнеспособного возбудителя внутриклеточно неинвазивными методами, т.е. без разрушения целостности клеточной стенки и без выделения ДНК.

Методика исследований. Клинические образцы. В качестве клинического материала использовали образцы сыворотки крови людей с подозрением на хламидиоз. Кроме того, у пациентов брали соскобы урогенитального тракта и кровь. Наличие клеток *S. trachomatis* было подтверждено при помощи коммерческого набора ХламиСкан (ООО ЛАБДиагностика, Россия) методом прямой иммунофлюоресценции.

Культура клеток. Для культивирования хламидий использовали клеточную линию McCoу (гибридная линия синовиальных клеток человека и мышинных фибробластов). Питательная среда состояла из DMEM/F-12 (1:1) с Хепесом и L-глутамином (ООО «БиолоТ», Россия), сыворотки крови лошади нормальной для культивирования микоплазм на питательных средах (ООО «БиолоТ», Россия), гентамицина (50 мг/фл), сухого стерильного для клеточных культур (ООО «БиолоТ», Россия). Для снятия клеток с культуральных матрасов использовали раствор Версена (ООО «БиолоТ», Россия).

Культивирование хламидий в культуре клеток McCoу. Для определения жизнеспособности и накопления биомассы клеток *S. trachomatis* инфицировали монослой культуры клеток McCoу взвесью хламидий по общепринятой методике [7].

Наличие генетического материала хламидий в культуре клеток McCoу подтверждали выделением ДНК, согласно инструкции коммерческого набора «ФБиоНуклео» для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала (ФракталБио, Россия).

Постановку ПЦР проводили согласно инструкции к коммерческому набору реагентов для выделения ДНК из клинических образцов (Вектор БЕСТ, Россия).

Для изучения возможности применения когерентно-оптических методов для детекции хламидий в культуре клеток McCoу использовали оригинальную установку сканирующего спекл-микроскопа (полупроводниковый лазер KLM (Кантегир, Россия) мощностью 5 мВт и длиной волны 650 нм, микрообъектив с увеличением 90 и числовой апертурой NA = 1,25 (ЛОМО, Россия)), моторизованный столик (Standa, Литва), фотоприемник

PDA-10 (Thorlabs, США), карта сбора данных (National Instruments, США).

Результаты исследований. Сыворотку крови с содержанием клеток *S. trachomatis* получили в клиничко-диагностической лаборатории Клиники кожных и венерических болезней Саратовского государственного медицинского университета им. Разумовского. Питательную среду для клеточной линии McCoу приготовили согласно рецептуре, представленной в таблице.

Культивирование хламидий проводили в 96-луночных планшетах в CO₂-инкубаторе (37 °С, 5 % CO₂) в течение 72 ч. После завершения инкубации из необходимого числа лунок удалили старую питательную среду и собрали содержимое лунок 96-луночного планшета при помощи раствора Версена. Собранный материал поместили в криопробирку, в которой механическим путем разрушали культуру клеток. Затем в пробирку положили 1–2 стеклянных бусины, интенсивно встряхивая в течение 3–4 мин. Содержимое криопробирки центрифугировали при 1000 мин⁻¹ в течение 10 мин. Надосадок отобрали в новую пробирку. После аналогично провели еще 2 пассажа исследуемого образца для накопления биомассы.

После 3-го пассажа проводили концентрирование биомассы центрифугированием при 15 000 в мин⁻¹ в течение 1 ч. Затем супернатант удаляли, а осадок разбавляли стерильным физраствором до 1000 мкл. Данные образцы в дальнейшем использовали для испытания сканирующего спекл-микроскопа. На рис. 1 представлена оптическая схема спекл-микроскопа.

Метод спекл-микроскопии адаптировали к проблеме обнаружения микробных клеток *S. trachomatis* в клинических образцах. Для этого прототип спекл-микроскопа, пространственное разрешение и выходные характеристики

Состав питательной среды для культуры клеток

Компоненты	На 100 мл
DMEM/F-12 (1:1) с Хепесом и L-глутамином	89 мл
Сыворотка крови лошади нормальная для культивирования микоплазм на питательных средах	10 мл
Гентамицин (50 мг/фл) сухой стерильный для клеточных культур	1 мл

проанализировали для лазерного сканирования ЭТ бактерий *C. trachomatis* внутри клеток McCoу, закрепленных на стекле.

Схема эксперимента. На каждом стекле были сделаны по три капли каждого образца: контроль (неинкубированные клетки McCoу), 2 ч инкубации клеток McCoу с *C. trachomatis*, 48 ч инкубации клеток McCoу с *C. trachomatis*. Примеры образцов для сканирования показаны на рис. 2.

Как известно, размер клетки *C. trachomatis* составляет около 200 нм, поэтому она существенно меньше длины волны лазерного источника в спекл-микроскопе. Это означает, что фазовая модуляция, вызываемая одной ячейкой, может рассматриваться как дельта-функция Дирака. В этом случае при сканировании ячейки *C. trachomatis* выходной сигнал спекл-микроскопа описывается сверткой гауссовой функции (описывающей профиль интенсивности в гауссовском пучке) с дельта-функцией. Результатом этой свертки является также гауссова функция. Выходной сигнал спекл-микроскопа показан на рис. 3. Внешний вид импульса (пик рассвета) соответствовал моменту сканирования одиночной ячейки *C. trachomatis* (см. рис. 3, а). Такой импульс не наблюдался в случае сканирования одиночной клетки McCoу, которая не содержала клетки *C. trachomatis* (см. рис. 3, б).

Заключение. В ходе исследований проблем с получением сигнала не возникло, поэтому данный метод может быть применен для детектирования хламидий внутри клеток McCoу.

Потенциально методика детекции хламидий с помощью спекл-микроскопа может быть использована для быстрого 2D сканирования клинических образцов, а также для автоматического обнаружения и распознавания клеток *C. trachomatis* практически в любых образцах.

Мы считаем, что данный метод спекл-микроскопии на настоящий момент перспективен, так как он является прототипом

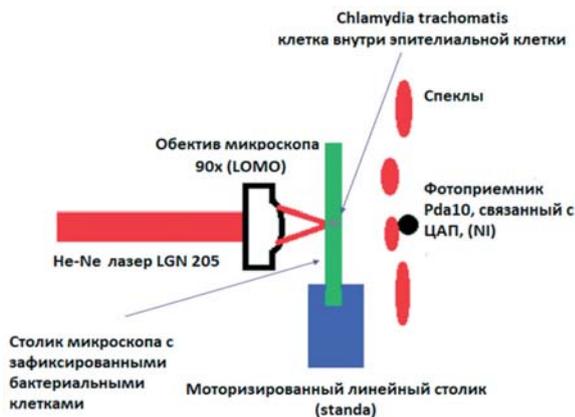


Рис. 1. Оптическая схема спекл-микроскопа



Рис. 2. Образцы для сканирования: 1 – контроль: неинкубированные клетки McCoу; 2 – 2 ч инкубации клеток McCoу с *C. trachomatis*; 3 – 48 ч инкубации клеток McCoу с *C. trachomatis*

совершенно нового приборного обеспечения, позволяющего решать многие задачи биотехнологии, ветеринарии и медицины.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дмитриев Г.А., Глазко И.И. Диагностика инфекций, передаваемых половым путем. – М.: БИНОМ, 2007. – 320 с.
2. Использование метода спекл-микроскопии для оценки действия токсинпродуцирующих штаммов кишечной палочки на микроциркуляцию крови / Д.В. Подшибякин [и др.] // Известия Саратовского университета. – 2008. – № 8. – С. 73–76.
3. Клиника, диагностика и лечение хламидийной инфекции: пособие для врачей / Л.В. Кудрявцева [и др.]. – М., 2005. – 61 с.

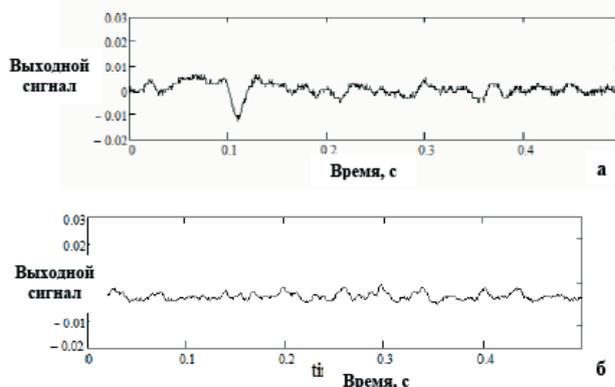


Рис. 3. Выходной сигнал спекл-микроскопа: а) пульс (отрицательный пик), превышающий уровень фоновых шумов, отчетливо виден, когда сфокусированное лазерное сканирование проводится только на клетках *C. trachomatis*; б) явных импульсов не наблюдается в случае сканирующей клетки McCoу, которая не содержит клетки *C. trachomatis*





4. Руководство по лабораторной диагностике инфекций урогенитального тракта / М. Домейка [и др.]. – СПб., 2012. – 288 с.

5. Integrating metagenomic and amplicon databases to resolve the phylogenetic and ecological diversity of the Chlamydiae / I. Lagkouvardos et. al. // ISME J., 2014, Vol. 8, P. 115–125.

6. Horn M. Chlamydiae as symbionts in eukaryotes // Annual Review of Microbiology, 2008, Vol. 62, P. 113–131.

7. Ulyanov S.S. Dynamics of speckles with a small number of scattering events: specific features of manifestation of the Doppler effect // Applied optics. – 2014, Vol. 53, No. 10, P. 94–102.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 171601099 на тему: Изучение молекулярных механизмов эволюции вирулентности и клонального доминирования эпидемических штаммов хламидий у сельскохозяйственных животных.

Филонова Надежда Николаевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологий, СарНИВИ – филиал ФГБНУ ФИЦВиМ. Россия.

Ульянова Онега Владимировна, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологий, СарНИВИ – филиал ФГБНУ ФИЦВиМ. Россия.

Субботина Ирина Анатольевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологий, СарНИВИ – филиал ФГБНУ ФИЦВиМ. Россия.

Зайцев Сергей Сергеевич, аспирант, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологий, СарНИВИ – филиал ФГБНУ ФИЦВиМ. Россия.

Салтыков Юрий Владимирович, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологий, СарНИВИ – филиал ФГБНУ ФИЦВиМ. Россия.

410028, г. Саратов, ул. 53 Стрелковой дивизии, 6. Тел.: (8452) 20-08-66.

Ульянов Сергей Сергеевич, д-р физ.-мат. наук, проф. кафедры «Медицинская физика», Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского. Россия.

410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83. Тел.: (8452) 27-85-29.

Ларионова Ольга Сергеевна, д-р биол. наук, проф., зав. кафедрой «Микробиология, биотехнология и химия», Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова. Россия.

410005, г. Саратов, ул. Соколова, 335. Тел.: (8452) 69-25-32.

Моисеева Юлия Михайловна, зав. лабораторией клиники кожных болезней, Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского. Россия.

410012, г. Саратов, ул. Б. Казачья, 112. Тел.: (8452) 27-33-70.

Федорова Валентина Анатольевна, д-р мед. наук, проф., главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологий, СарНИВИ – филиал ФГБНУ ФИЦВиМ. Россия.

410028, г. Саратов, ул. 53 Стрелковой дивизии, 6. Тел.: (8452) 20-08-66.

Ключевые слова: *Chlamydia trachomatis*; спекл-микроскопия; когерентно-оптические методы; ранняя диагностика хламидиоза; сканирование единичных клеток.

APPLICATION OF COHERENT-OPTICAL METHODS FOR EARLY DIAGNOSIS OF CHLAMYDIA

Filonova Nadezhda Nikolaevna, Junior Researcher of the laboratory of Molecular Biology and Nanobiotechnology; Researcher Federal Research Center for Virology and Microbiology, Branch. Russia.

Ulyanova Onega Vladimirovna, Senior Researcher of the laboratory of Molecular Biology and Nanobiotechnology; Researcher Federal Research Center for Virology and Microbiology, Branch. Russia.

Subbotina Irina Anatolyevna, Junior Researcher of the laboratory of Molecular Biology and Nanobiotechnology; Researcher Federal Research Center for Virology and Microbiology, Branch. Russia.

Zaytsev Sergey Sergeevich, Post-graduate Student, Researcher of the laboratory of Molecular Biology and Nanobiotechnology; Researcher Federal Research Center for Virology and Microbiology, Branch. Russia.

Saltykov Yury Vladimirovich, Researcher of the laboratory of Molecular Biology and Nanobiotechnology; Researcher Federal Research Center for Virology and Microbiology, Branch. Russia.

Ulyanov Sergey Sergeevich, Doctor of Physical and Mathematical Sciences, Professor of the chair “Medical Physics”, Saratov National Research State University named after N.G. Chernyshevskiy. Russia.

Larionova Olga Sergeevna, Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the chair “Microbiology, Biotechnology and Chemistry”, Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov. Russia.

Moiseeva Yulia Mikhaylovna, Head of the laboratory of Clinics for skin disease, Saratov State Medical University named after V.I. Razumovskiy. Russia.

Feodorova Valentina Anatolyevna, Doctor of Medical Sciences, Professor, Senior Researcher of the laboratory of Molecular Biology and Nanobiotechnology; Researcher Federal Research Center for Virology and Microbiology, Branch. Russia.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*; speckle-microscopy; coherent optical methods; early diagnosis of chlamydia; scanning of single cells.

The article considers the possibility of using a scanning speckle microscope for fast 2D scanning of clinical samples containing chlamydia. Modern methods of laboratory diagnosis of chlamydia do not confirm the presence of a viable pathogen in the early stages of infection. The use of coherent-optical methods allows one to automatically detect even single C. trachomatis cells in virtually any sample.