

ФГАОУ ВО «ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.М.СЕЧЕНОВА»

МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РФ

(СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи

Родина Елизавета Сергеевна

**Совершенствование верификации микробиологического разнообразия
глазной поверхности методом сканирующей электронной микроскопии с
лантаноидным контрастированием**

3.1.5. Офтальмология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
кандидат медицинских наук
Фетцер Елена Игоревна

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Диагностика инфекционного агента при микробных кератитах.....	12
1.2. Эпидемиология и основные факторы риска возникновения микробного кератита	16
1.3. Исследование микробиома глазной поверхности при состояниях, способствующих возникновению микробного кератита	20
1.4. Исследование микробного сообщества глазной поверхности без инфекционного воспаления	25
1.4.1. Исследование микробного сообщества «здоровой» глазной поверхности культуральным методом	25
1.4.2. Исследование микробиологического разнообразия «здоровой» глазной поверхности методами световой микроскопии первичного материала.....	29
1.5. Проблемы верификации микробиологического разнообразия разными методами исследования на примере условно нормальной микробиоты глазной поверхности	34
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.....	41
2.1. Изображения для описания формальных признаков, присущих микроорганизмам глазной поверхности, и составления атласа-определителя ...	41
2.2. Клинические группы	42
2.3. Алгоритм забора биоматериала (импрессионная цитологическая проба) и пробоподготовки для сканирующей электронной микроскопии	45
2.4. Алгоритм забора биоматериала для культурального исследования	45
2.5. Сканирующая электронная микроскопия	46
2.6. Культуральный метод исследования.....	46
2.7. Термография	47
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	49
3.1. Алгоритм фенотипической идентификации микробиологических объектов, выявляемых на глазной поверхности	49
3.1.1. Царство бактерии	49
3.1.1. Царство грибы	65
3.1.2. Простейшие	67

3.2. Температурный оптимум роста микроорганизмов, выделенных с глазной поверхности.....	68
3.2.1. Возможные причины изменения оптимальной температуры культивирования микроорганизмов.....	70
3.3. Сравнение данных результатов культурального метода и сканирующей электронной микроскопии с лантаноидным контрастированием условно здоровой и инфицированной глазной поверхности	75
3.3.2. Сопоставление результатов исследования микробиоты условно здоровой глазной поверхности, полученных культуральным методом и сканирующей электронной микроскопии с лантаноидным контрастированием	76
3.3.3. Сопоставление результатов исследования микробиоты «здоровой» глазной поверхности методом сканирующей электронной микроскопии с лантаноидным контрастированием с известными представлениями о микробиологическом разнообразии.....	76
3.3.4. Результаты идентификации инфекционного агента при воспалительных заболеваниях глазной поверхности культуральным методом	78
3.3.5. Сопоставление результатов идентификации инфекционного агента при воспалительных заболеваниях глазной поверхности методом сканирующей электронной микроскопии и культуральным методом.....	79
3.4. Верификация микробиологического разнообразия «здоровой» и инфицированной глазной поверхности	81
3.4.1. Результаты исследования микробного профиля «здоровой» глазной поверхности методом сканирующей электронной микроскопии с лантаноидным контрастированием	81
3.4.2. Результаты визуализации инфекционного агента при воспалительных заболеваниях глазной поверхности методом сканирующей электронной микроскопии с лантаноидным контрастированием	88
3.5 Практические рекомендации по использованию фенотипической идентификации микроорганизмов для верификации данных диагностики при микробном кератите посредством применения сканирующей электронной микроскопии с лантаноидным контрастированием	94
ВЫВОДЫ	103
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	105
Список сокращений	106
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:	107

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Исследование микробиоты (сообщества микробов организма, которые представляют собой резидентную микрофлору) проводится уже более 300 лет. Значительно позже появилось понятие микробиом (совокупность геномов микроорганизмов, составляющих микробиоту), оно было введено сравнительно недавно в 2001 г., это связано с тем, что его исследование возможно только при использовании молекулярно-генетических методов. Вплоть до первого десятилетия 21 века основным методом исследования микробиоты глазной поверхности (ГП) являлся культуральный метод. Первое исследование микробиома ГП методом секвенирования рДНК было проведено в 2011г., что расширило представление о микробиоме ГП, так как количество микроорганизмов, выявляемых с помощью метагеномного исследования, было значительно выше, чем разнообразие, которое получали с помощью культурального метода [46].

За последние годы возросло число опубликованных исследований, посвященных изучению микробиоты и микробиома ГП, что связано с возрастающим интересом к вопросам влияния микроорганизмов как на общее здоровье человека, так и на локальный статус колонизируемых областей. Как известно, микроорганизмы, колонизирующие различные органы и слизистые оболочки организма, такие как: кишечник, ротовая полость, слизистые половой системы, оказывают значительное влияние на поддержание гомеостаза и иммунной защиты [67]. В некотором приближении можно говорить о том, что представление о значимости влияния комплекса микроорганизмов на состояние ГП было унаследовано из работ, рассматривающих другие органы. Исторически, кишечник был первой локацией микробиологического исследования, где это влияние установлено. Сейчас нет сомнений, что изменение в кишечной микробиоте могут способствовать развитию таких состояний, как ожирение, сахарный диабет (СД), онкологические заболевания, воспалительные заболевания кишечника [68, 83, 97].

Полученные данные вызвали большой интерес к исследованию различных локальных сообществ микроорганизмов для поиска взаимосвязи между изменением количественного и качественного состава микробиоты и возникновением патологических состояний. Поиски такой взаимосвязи происходят и в исследованиях по изучению микробиома ГП. В связи с этим особенно актуальными становятся исследования, направленные на улучшение алгоритмов верификации микробного сообщества ГП, его качественного и количественного состава.

Отсутствие единых подходов к верификации микроорганизмов, колонизирующих ГП, приводит к тому, что до сих пор нет однозначного мнения по поводу наличия основной микробиоты, характерной именно для ГП [59]. Наряду с этим не существует и однозначного мнения о том, какое состояние ГП можно назвать «нормальным». В большинстве случаев термин «нормальная микробиота ГП» определяет состав микробиоты в отсутствие заболеваний непосредственно органа зрения и придаточного аппарата. В этом случае возникает несколько неопределенностей при описании «нормальной» микробиоты: включать ли рефракционные искажения в ограничительный список заболеваний, и рассматривать ли тяжелые системные заболевания, не затронувшие на момент исследования орган зрения непосредственно? Очевидно, что вариабельность отчасти будет связана с некорректными ограничениями базовой выборки исследуемых лиц.

Проблема верификации микроорганизмов, входящих в состав микробиоты ГП, существует не только в области фундаментальных исследований микробиоты и микробиома. В широкой клинической практике офтальмолог также нуждается в методах, позволяющих быстро уточнить инфекционный агент при острых инфекционных заболеваниях ГП, в том числе – при микробных кератитах (МК). Своевременная верификация возбудителя МК остается серьезной проблемой в офтальмологии. Стандартом диагностики инфекционного агента является культуральное исследование биологических образцов с ГП. Однако лечение обычно назначается эмпирически, до получения результатов бактериологического

исследования, основываясь на характерных клинических признаках. Это обусловлено длительностью получения результатов культурального исследования (5–7 дней) и необходимостью незамедлительного начала этиотропного лечения. Во многих случаях МК при несвоевременной верификации микробного агента и лечении, назначенном без учета возбудителя заболевания и приводит к выраженному снижению остроты зрения и инвалидизации, а также к необходимости оперативного вмешательства на переднем отрезке глаза (послойная и сквозная кератопластика (СКП)).

На данный момент проведено много исследований, посвященных изучению микробиоты и микробиома при состояниях, способствующих возникновению МК [23, 32, 73, 75]. Исследователи используют следующие методы: культуральное исследование, микроскопия, молекулярно-генетические. Большинство ученых приходят к выводу о том, что для успешной своевременной идентификации микроорганизмов, вызывающих воспаление ГП, необходимо использовать все доступные методы исследования [43]. В таком случае у врачей увеличивается сомнение в достоверности получаемых результатов, поскольку встречаются случаи несовпадения данных разных методов исследования.

В настоящей работе исследуется возможность адаптировать сканирующую электронную микроскопию с лантаноидным контрастированием (СЭМ+ЛК) для микробиологического анализа импрессионной пробы, полученной с ГП, и показать, что эта совокупность методов может служить тем самым превентивным референсом, который позволит верифицировать результаты прочих микробиологических тестов.

Цель исследования

Целью настоящего исследования явилось совершенствование верификации микробиологического разнообразия ГП в норме и при воспалительных заболеваниях посредством применения метода сканирующей электронной микроскопии с лантаноидным контрастированием.

Задачи исследования:

1. Изучение характерных признаков, присущих наиболее распространенным патогенным и симбионтным микробам, на материале эталонных культур и их сообществ, проявляющиеся при использовании лантаноидного контрастирования (ЛК) на СЭМ-изображениях.
2. Разработка алгоритма, позволяющего визуализировать импрессионную пробу с ГП с помощью СЭМ+ЛК с последующей верификацией микробиологического разнообразия.
3. Разработка методики формализации визуальных данных о морфологии микроорганизмов, выявляемых на ГП методом СЭМ+ЛК.
4. Оценка влияния индивидуальной температуры ГП на эффективность культивирования микроорганизмов в разных температурных условиях.
5. Сравнение данных о микробиологическом разнообразии ГП, получаемых культуральным методом и методом СЭМ+ЛК.
6. Описание «нормальной» микробиоты ГП с помощью метода СЭМ+ЛК.
7. Описание «патологического» спектра микроорганизмов, способных вызывать МК, с помощью метода СЭМ+ЛК при воспалительных офтальмологических патологиях.
8. Оценка возможности использования метода СЭМ+ЛК в качестве экспресс метода микробиологической диагностики в офтальмологии.

Научная новизна работы

1. С помощью прогрессивного метода СЭМ+ЛК впервые были формализованы характерные морфологические признаки наиболее частых патогенных микроорганизмов, способных вызывать МК.

2. Впервые методом импрессионной цитологии и СЭМ+ЛК был охарактеризован спектр микроорганизмов, колонизирующих условно здоровую ГП.
3. Впервые методом СЭМ+ЛК были охарактеризованы микроорганизмы, вызывающие МК.
4. Продемонстрирована возможность применения СЭМ+ЛК в качестве метода экспресс-диагностики при инфекционных воспалениях роговицы.
5. Впервые метод СЭМ+ЛК предложен в качестве метода верификации данных о микробиологическом разнообразии, получаемом посредством других методов исследования.

Личный вклад автора в проведенное исследование

Личный вклад автора заключается в непосредственном участии в подготовке и проведении всех клинических исследований, обработке полученных данных, анализе и интерпретации результатов, подготовке публикаций и докладов по теме диссертационной работы. Автор, являясь сертифицированным оператором СЭМ, непосредственно проводил весь цикл пробоподготовки и исследования от забора импрессионной пробы до получения изображений на СЭМ и их интерпретации.

Теоретическая и практическая значимость

1. В процессе исследования был затронут теоретический фундаментальный аспект биологии, касающийся коэволюции человека и микроорганизмов, колонизирующих ГП с точки зрения адаптивности к температурным условиям хозяина в случае нарушения терморегуляции. В частности, была показана необходимость применения расширенных протоколов при культивировании микроорганизмов, вызывающих МК при сочетании с нарушением терморегуляции ГП.

2. Было продемонстрировано, что предлагаемый метод верификации позволяет доказать соответствие (по фенотипическим признакам) выделенных культуральным методом микроорганизмов тем патогенам, которые были визуализированы в импрессионной пробе с ГП.
3. В ряде случаев целесообразно рассматривать предлагаемый метод СЭМ+ЛК в качестве метода предварительной экспресс-диагностики. Несмотря на низкую специфичность, решение вопроса о принадлежности основного патогена к царству (бактерии/грибы) и некоторым группам известных бактерий, позволит избежать выбора несовместимых стратегий медикаментозной терапии.
4. Внедрение предложенного метода в рутинную практику может привести к уменьшению инвалидизации пациентов вследствие слепоты и неудовлетворительных исходов лечения МК а также снижению затрат, связанных с оперативными вмешательствами и последующей реабилитацией этих пациентов. Предварительная оценка говорит о том, что предложенная верификация данных лабораторного культивирования, применяемого в качестве «золотого стандарта» диагностики, позволит сократить количество ложно-отрицательных результатов минимум на 17%.

Методология и методы диссертационного исследования

Методологической основой диссертационной работы явилось применение комплекса методов научного познания, а именно культурального метода исследования, СЭМ+ЛК и бесконтактной инфракрасной термографии (ИКТ). Диссертационное исследование выполнено в соответствии с принципами научного исследования. Работа реализована в дизайне одномоментного обсервационного клинического исследования с использованием клинических и аналитических методов.

Положения, выдвигаемые на защиту:

1. При использовании СЭМ+ЛК в качестве метода визуализации биологического материала ГП, обнаруживаемые на ней микроорганизмы будут обладать достаточным количеством формальных признаков для их сопоставления с эталонными культурами основных патогенов и комменсалов.
2. Данные валидных методов лабораторной диагностики не дают реального представления о микробиологическом разнообразии ГП, так как выявляемое фенотипическое разнообразие методом прямой визуализации, проводимой посредством СЭМ+ЛК, оказывается систематически большим, чем известное по опубликованным данным разнообразие, выявляемое ПЦР-идентификацией и культуральным методом изучения.
3. Разработанный экспресс-метод диагностики позволяет идентифицировать возможные патогенные микроорганизмы с разной таксономической глубиной. Предварительная оценка чувствительности метода может быть дана по совпадениям результатов перекрестной диагностики на уровне таксона "царство" и высших таксонов фенотипической классификации: в 24 из 30 случаев МК, подтвержденного культуральным методом, и в 45 из 50 случаев МК предполагаемого по клиническим признакам.

Степень достоверности и апробация результатов работы

Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, основаны на оригинальных методах анализа и подтверждены воспроизводимостью полученных результатов. Степень достоверности научных выводов, сделанных автором, определяется достаточным количеством клинико-экспериментальных наблюдений с использованием современных методов исследования. Основные положения диссертации были представлены на Научно-практической конференции «Воспаление глаза» (23 октября 2021 г., 11 ноября 2023 г., Москва) и на научной конференции аспирантов и молодых ученых «Избранные вопросы офтальмологии» (17 июня 2022 г.) кафедры глазных болезней ФГАОУ ВО

«Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский Университет).

Внедрение результатов работы в практику

Полученные в ходе настоящего исследования результаты и разработанные методики успешно внедрены и активно применяются в клинической работе ФГБНУ «НИИ глазных болезней имени М.М.Краснова» и научно-исследовательской работе ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский Университет).

Публикации по теме исследования

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 5 работ в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ для публикации основных результатов диссертации на соискание ученой степени кандидата наук.

Структура и объем диссертационной работы

Диссертация изложена на 119 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 42 рисунками и 10 таблицами. Библиографический указатель содержит 106 источника (16 отечественных и 90 зарубежных).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Диагностика инфекционного агента при микробных кератитах

Исторически основным способом исследования микроорганизмов являлся традиционный культуральный метод. У него есть свои преимущества и недостатки. К положительным сторонам относится высокая доступность данного метода. Ограничением метода представляется длительность ожидания результатов исследования (5–7 суток), неуверенность в том, что все виды живых микроорганизмов, присутствовавших в пробе, были представлены в результате культивирования, или же, наоборот, что случайная контаминация образца в процессе забора материала не представлена в качестве легитимных результатов анализа.

По мере появления новых открытий в микробиологии происходило расширение филогенетической, морфологической и биохимической классификаций микроорганизмов [29]. Появились селективные питательные среды, биохимические тесты и специальные условия для культивирования, что увеличило диагностическую ценность метода и повысило производительность выполнения теста, однако, это не решило проблему медленнорастущих микроорганизмов. Идентификация микроорганизмов сложна при малом количестве биологического материала, которое характерно при заборе образцов с ГП.

Бактериальный кератит. Бактериологическое исследование при бактериальном кератите включает в себя следующие этапы: преаналитический, аналитический и постаналитический [9]. На первом, преаналитическом этапе непосредственное участие принимает врач-клиницист, который задает траекторию дальнейшего исследования, поскольку именно он определяет место и способ забора

биологического материала, хранение и транспортировку полученных образцов и предполагает возможный инфекционный агент [27, 71]. Это, в свою очередь, оказывает влияние на выбор микробиологом питательных сред и условий, необходимых для исследования материала [6, 71]. Забор проб для посева с ГП обычно производится врачом-офтальмологом. Стерильным ватным зондом-тампоном биологический материал собирают с роговичного инфильтрата или с краев и основания язвы, также возможен анализ материала, полученного после сквозной или послойной кератопластики, с поверхности КЛ, контейнера для хранения КЛ. Затем, собранные образцы помещают в пробирку с жидкой питательной средой для дальнейшей транспортировки в бактериологическую лабораторию [11, 12, 16, 18]. То есть продуктивное взаимодействие между клиницистом и микробиологической лабораторией является залогом успешного исследования.

Грибковый кератит. Диагноз ставится на основании клинических признаков, реакции на противогрибковую лекарственную терапию, результатов культурального исследования и микроскопии первичного материала. Бактериологическое исследование проводится на специальных питательных средах агар Сабуро.

При биомикроскопии выделяют несколько характерных симптомов: сухая поверхность инфильтрата, перистые края язвы, наличие очагов сателлитов, пигментированная язва, выраженная инфильтрация, преципитаты на эндотелии, гипопион. Бактериологическое исследование включает в себя забор материала из очага воспаления с краев язвы, затем осуществляется посев на селективные (агар Сабуро, картофельно-глюкозный агар) и неселективные (кровяной агар, хромотогенный агар) питательные среды с добавлением хлорамфеникола или гентамицина при смешанных кератитах для подавления роста сопутствующей бактериальной флоры. Грибы на питательных средах растут более медленно по сравнению с бактериями. Длительность культивирования в среднем составляет 1–2 недели, температурные условия составляют 25–30 °С для филаментозных грибов (*Fusarium*, *Aspergillus*), 37 °С для дрожжеподобных (*Candida*).

При микроскопии первичного материала с подозрением на грибковый кератит применяются окрашивание по Граму, фиксация раствором гидроксида калия, калькофлуором белым, окрашивание лактофенолом хлопковым голубым [48, 50, 69]. Визуализируются гифы, мицелий, конидии, грибковые клетки.

Акантамебный кератит. Акантамеба является простейшим, обитающим в воде и почве. Источником питания для нее служат бактерии. Жизненный цикл включает в себя две формы: трофозоит с псевдоподиями и цисту с многослойной оболочкой.

Акантамебный кератит (АК) – это тяжелое заболевание, которое приводит к потере зрения, тяжело поддается консервативному лечению и часто приводит к необходимости хирургического вмешательства. Частота встречаемости АК варьирует от 1 до 5 % среди других видов инфекционного кератита [64, 74, 99]. Такой невысокий показатель распространенности может быть обусловлен тем, что значительная доля этиологически неподтвержденных инфекционных кератитов может потенциально носить акантамебную этиологию. Также играет роль трудоемкий процесс диагностического поиска, поскольку в случае АК среднее время между обращением к офтальмологу и постановкой диагноза составляет от 15 до 68 дней [63].

Чаще всего АК связывают с ношением КЛ, поскольку высока вероятность ее попадания на ГП через загрязненные руки и КЛ [31]. Также в связи с тем, что микробиом носителей МКЛ отличается от условно здоровой ГП в сторону увеличения обсемененности микроорганизмами, есть предположение, что это создает благоприятные условия для акантамебы. Диагноз АК ставится на основании клинической картины, результатов бактериологического исследования, отсутствия положительного ответа на лечение противогрибковыми и антибактериальными препаратами. Однако есть случаи АК, не ассоциированные с ношением КЛ, которые связывают с предшествующей травмой роговицы и попаданием загрязненной акантамебами воды на поверхность роговицы [91]. Классические клинические признаки АК включают в себя: выраженный болевой синдром, не соответствующий клинической картине, кольцевидный инфильтрат,

радиальный периневрит. Однако во многих случаях специфических клинических симптомов не наблюдается, клиническая картина может быть представлена точечной кератопатией, субэпителиальным инфильтратом, эрозией роговицы. Также меньше специфичных клинических признаков наблюдается при АК, не связанным с ношением КЛ.

К основным методам идентификации акантамебы относятся ПЦР, посев на питательную среду Робинсона, микроскопия с окрашиванием калькофлюором белым, конфокальная микроскопия, гистопатологические исследование инфицированной роговицы после сквозной или послойной кератопластики.

В последнее время появляются научные публикации, исследующие возможности молекулярно-генетических методов в диагностике АК. По данным авторов, 18S рРНК ПЦР показывает высокие результаты: чувствительности 87,5%, специфичности 97,8% [105]. ПЦР довольно быстрый метод диагностики, длительность в среднем составляет 2–3 дня, достоверность высокая, однако не все лаборатории оснащены необходимым для проведения ПЦР оборудованием.

При флюоресцентной микроскопии с окрашиванием калькофлюором белым визуализируются ярко-зеленые цисты с двойной оболочкой. По данным литературы чувствительность составляет 71%, а специфичность 96% [100].

Конфокальная микроскопия зависит от опыта оператора, проводящего исследование, поскольку необходима интерпретация полученных изображений. В научной публикации авторы определили, что прогностическая ценность положительного результата конфокальной микроскопии составляет 87,5%, а прогностическая ценность отрицательного результата – 58,5% [42]. Также были выделены характерные паттерны, которые визуализируются на снимках: яркие пятна (круглые или овальные гиперрефлективные объекты без двойной стенки; диаметр <30 мкм); целевые изображения (гиперрефлективные объекты с гипорефлективным ореолом, диаметр <30 мкм); скопления гиперрефлективных объектов (диаметр <30 мкм); трофозоитоподобные объекты (диаметр >30 мкм).

1.2. Эпидемиология и основные факторы риска возникновения микробного кератита

Наиболее частыми возбудителями бактериального кератита среди грамположительных микроорганизмов являются бактерии следующего рода (Таблица 1) : *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*; среди грамотрицательных бактерий чаще всего выделяют *Pseudomonas*, *Serratia*, *Moraxella*, *Haemophilus* [8, 10, 26, 60, 64, 77, 89, 99]. Лидирующее место среди грамположительных бактерий, вызывающих МК, занимает род *Staphylococcus*, который часто колонизирует кожу и слизистую оболочку в норме, представляет собой условно-патогенную флору. Среди грамотрицательных микроорганизмов род *Pseudomonas* чаще всего является причиной бактериального кератита, также указанный род часто выступает инфекционным агентом при кератите, ассоциированным с ношением КЛ, поскольку способен образовывать биопленки на внутренней поверхности КЛ, контактирующей с ГП. Основным методом идентификации микроорганизмов, вызывающих инфекционное воспаление ГП, служит культуральный. По данным научной литературы, степень выявления инфекционного агента при посеве на питательные среды биологического материала с ГП при инфекционных кератитах составляет 23,7–71,6% [25, 26, 60, 74, 86, 103].

Среди основных факторов риска микробного кератита выделяют: ношение КЛ, СД, перенесенные оперативные вмешательства на ГП, включающие экстракцию катаракты и кераторефракционную хирургию, сквозную и послойную кератопластику, заболевания век, длительное использование местных кортикостероидов.

При кератомикозах наиболее частыми этиологическими агентами выступают грибы родов *Fusarium*, *Aspergillus* и *Candida* (Таблица 2). Основным методом их идентификации служит культуральный метод исследования и прямая микроскопия первичного материала. Методы молекулярно-генетического исследования

применяются реже, в научных источниках литературы проводится сравнение ПЦР с культуральным методом и микроскопией. По данным авторов, чувствительность ПЦР в различных исследованиях составляет 70-95 %, специфичность — 57-71 %, отрицательная прогностическая ценность — 48- 80 % и положительная прогностическая ценность — 86-88 % [38, 52, 81, 104]. Молекулярно-генетические методы показывают довольно хорошие результаты, однако ограничением их внедрения в рутинную клиническую практику представляется недостаточное повсеместное распространение современных методов исследования в микробиологические подразделения больниц. Встречаются и редкие возбудители, которые вызывают фульминантное течение кератита и устойчивы к известным фунгицидным препаратам [58]. Такие нехарактерные возбудители кератомикозов удастся идентифицировать методом ПЦР и секвенированием, поскольку традиционным культуральным методом невозможно определить микроорганизмы по морфологическим и фенотипическим характеристикам, так как ранее не было случаев инфицирования человека данными редкими патогенами. Крайне важна своевременная идентификация микроорганизмов и правильно назначенная лекарственная терапия, поскольку грибковый кератит часто приводит к значительному снижению зрения и необходимости хирургического вмешательства.

Основные возбудители кератомикозов могут отличаться в зависимости от географического расположения страны, региона, основного вида деятельности населения. Более часто грибковые кератиты встречаются в развивающихся странах, с преобладанием сельского хозяйства, в тропических и субтропических регионах. Это связано с тем, что увеличивается риск получения травмы роговицы инородным телом растительного происхождения, приводящее к инфицированию раны грибковой флорой. Также выделены клинические признаки, позволяющие предположить определенный вид грибов: наличие гипопиона и пигментации в основном связывают с *Dematiaceous*, наличие эндотелиальных бляшек в чаше связано с инфекциями *Fusarium*, тогда как дендритные поражения и складки десцеметовой мембраны наблюдались преимущественно при кератите, вызванном *Aspergillus* [76].

Таблица 1 – Основные роды и виды бактерий, вызывающие микробный кератит.

Окраска по Граму	Тип	Род	Вид	Культуральный метод исследования	
Грам+	Firmicutes	Staphylococcus	<i>Staphylococcus sp.</i>	[26, 60, 77, 86, 89, 104]	
			<i>Staphylococcus aureus</i>	[26, 60, 77, 86, 89, 104]	
			<i>Staphylococcus auricularis</i>	[60, 77]	
			<i>Staphylococcus epidermidis</i>	[60]	
			<i>Staphylococcus lentus</i>	[60]	
			<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	[60]	
			<i>Staphylococcus warneri</i>	[60, 77]	
			<i>Staphylococcus cohnii ss. Urealiticus</i>	[77]	
			<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	[60, 77]	
			<i>Staphylococcus simulans</i>	[60, 77]	
			<i>Staphylococcus tetragenus</i>	[60]	
			<i>Staphylococcus hominis</i>	[60, 77]	
			<i>Staphylococcus hyicus</i>	[60]	
			<i>Staphylococcus intermedius</i>	[60]	
			<i>Unspecified CoNS</i>	[26, 77]	
		<i>Aerococcus sp.</i>	[60]		
Грам+	Actinobacteria	Micrococcus	<i>Micrococcus sp.</i>	[60, 77, 86]	
			<i>Micrococcus luteus</i>	[77]	
		Kocuria	<i>Kocuria sp.</i>	[60]	
			<i>Kocuria kristinae</i>	[60]	
			<i>Kocuria rosea</i>	[60]	
		Dermacoccus	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	[77]	
			<i>Corynebacterium sp.</i>	[77, 86, 89]	
		Firmicutes	Streptococcus	<i>Streptococcus sp.</i>	[26, 77, 86, 104]
				<i>Streptococcus constellatus ssp.</i>	[77]
				<i>Streptococcus dysgalactiae ss</i>	[77]
	<i>Streptococcus viridans group</i>			[26, 77]	
	<i>Streptococcus pyogenes</i>			[77]	
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>			[26, 86, 104]	
	<i>Streptococcus sanguinis</i>			[77]	
	<i>Streptococcus parasanguinis</i>			[77]	
	<i>Enterococcus sp.</i>	[77]			
	Bacillus	<i>Bacillus subtilis</i>	[60]		

Продолжение Таблицы 1

			<i>Bacillus spp.</i>	[60, 77, 104]
		Brevibacillus	<i>Brevibacillus sp.</i>	[77]
		Leuconostoc	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	[60]
Грам-	Proteobacteria	Pseudomonas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	[26, 60, 89, 104]
			<i>Pseudomonas mendocina</i>	[77]
			<i>Pseudomonas putida</i>	[77]
		Escherichia	<i>Escherichia coli</i>	[60]
		Burkholderia	<i>Burkholderia cepacia</i>	[60]
		Enterobacter	<i>Enterobacter cloacae</i>	[60]
		Sphingomonas	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	[77]
		Aeromonas	<i>Aeromonas hydrophila</i>	[77]
		Morganella	<i>Morganella morganii ss.</i>	[77]
		Achromobacter	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	[77]
			<i>Achromobacter denitrificans</i>	[77]
		Pantoea	<i>Pantoea agglomerans</i>	[77]
			<i>Pantoea sp.</i>	[77]
		Providencia	<i>Providencia rettgeri</i>	[77]
		Serratia	<i>Serratia sp.</i>	[26, 60, 77, 89, 104]
			<i>Serratia marcescens</i>	[26, 60, 77, 89]
		Moraxella	<i>Moraxella sp.</i>	[26, 77, 104]
			<i>Moraxella catarrhalis</i> (диплококки)	[77]
Haemophilus	<i>Haemophilus influenzae</i>	[77, 104]		
Acinetobacter	<i>Acinetobacter baumannii</i>	[77]		
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	[77]		

Таблица 2 – Грибы, вызывающие кератомикозы

Тип грибов	Род грибов	Культуральный метод	ПЦР
Гифальные(нитевидные)	Fusarium sp.	[38, 48, 50, 60, 76, 81, 89, 106]	[38, 76, 81]
	Aspergillus sp.	[50, 60, 89, 81, 76, 106]	[38, 76]
	Aspergillus flavus	[38, 48, 76, 81]	[81]
	Aspergillus fumigatus	[38, 76, 81]	[81]
	Helminthosporium maydis	[60]	-
	Curvularia	[60, 76, 81, 106]	[76]
	Mucor	[60]	-

Продолжение Таблицы 2

Гифальные(нитевидные)	Penicillium	[60, 89]	-
	Cladosporium	[38, 48, 50]	[76]
	Drescherella	[38]	-
	Botryodiplodia theobromae	[106]	-
	Bipolaris hawaiiensis	[106]	-
	Colletotrichum capsici	[106]	-
	Alternaria spp.	[50, 106]	-
	Acremonium	[50, 106]	-
	Arthrotrichum	[106]	-
	Paecilomyces	[50]	-
	Exserohilum	[76]	-
	Lasiodiplodia	[76]	[76]
	Cladorrhinum	-	[76]
	Pseudallescheria	[50]	-
	Papulaspora	[76]	[76]
Exserohilum	-	[76]	
Дрожжеподобные	Zymoid epiphyte	[60]	-
	Candida	-	[38]
	Candida albicans	[38, 60, 89]	-
	Yeast	[60]	-

1.3. Исследование микробиома глазной поверхности при состояниях, способствующих возникновению микробного кератита

Изучение микробиома у носителей контактных линз разными методами исследования. Остается открытым вопрос: насколько с точки зрения микробиологии можно считать «здоровой» ГП при ношении контактных линз,

даже если нет клинических проявлений измененного ее состояния? Для того, чтобы это установить, необходимо рассмотреть случаи очевидного смещения микробиального паттерна. Наиболее частыми осложнениями при использовании КЛ считаются аллергический конъюнктивит и микробный кератит [62, 78]. Рассмотрим несколько работ, посвященных исследованию микробиального окружения ГП у носителей КЛ с симптомами, которые можно отнести к аллергическим реакциям, не сопровождающимся кератитом. В статье, посвященной микробиомному анализу многофункциональной жидкости из футляров для хранения КЛ и слезной жидкости участников исследования с аллергическими симптомами (АС) на фоне ношения КЛ и без АС (контрольная группа), исследование проводилось двумя методами: культуральным и секвенированием 16S рДНК [62]. Результаты посевов не показали каких-либо статистически значимых различий между участниками с АС и бессимптомными носителями МКЛ, а рост материала, взятого из слезной жидкости, наблюдался только у 1 участника (*Staphylococcus capitis*). Однако метагеномный метод исследования показал повторяющиеся результаты для слезной жидкости и раствора из футляров для хранения КЛ. Детальный популяционный анализ показал, что количество грамположительных бактерий в микробиомах растворов для ухода за КЛ, используемых участниками с АС, было выше, чем у бессимптомных ($42,24 \pm 9,47$ против $16,85 \pm 22,76\%$). Среди них доминирующим родом был *Streptococcus* (численность 12,1–18,3%). Также в подтверждение вовлеченности *Streptococcus* был проведен вестерн-блот анализ Ig-E слезной жидкости к *Streptococcus* и к *Staphylococcus*. Слезный IgE у всех испытуемых с АС реагировал со стрептококком (100%), но не со стафилококком. Однако в анализе участвовали не все участники с АС (6 из 9). Ракша Л. с соавторами также проводили исследование микробиоты носителей КЛ с наличием симптомов (покраснение, ощущение песка, сухость) и без них, используя только культуральный метод исследования. Забор биологического материала осуществлялся с конъюнктивы, поверхности КЛ и футляра для хранения КЛ [39]. В этой статье авторы получили следующие результаты микроорганизмы *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus*

aureus, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus vulgaris*, *Non-albicans Candida* были выделены только от носителей КЛ с симптомами, и ни от одного из участников, использующих КЛ бессимптомно. В данном случае в статьях со схожим дизайном получили разные данные культурального метода исследования. Такое расхождение может объясняться тем, что отличались места забора материала и использовались различные питательные среды.

Распространено мнение, что ношение КЛ является фактором риска в развитии микробного кератита. Есть несколько гипотез, которые отражают взаимосвязь между ношением КЛ и развитием кератита, ассоциированного с ношением КЛ. Одна из таких гипотез объясняет это изменением в микробиоте ГП у носителей КЛ, что снижает защитную функцию комменсальных микроорганизмов и приводит к увеличению доли условно-патогенных микроорганизмов [22]. Также известно, что на поверхности КЛ адгезируются микроорганизмы, образуя бактериальные биопленки, биопленкообразование является защитным фактором для микроорганизмов и повышает их устойчивость, в том числе — и к антибактериальным агентам [30, 94]. При исследовании факторов риска возникновения роговичных инфильтратов при длительном ношении силикон-гидрогелевых линз обнаружилась взаимосвязь между большей бактериальной бионагрузкой на КЛ и курением [85].

В ставшей классической работе, Шин Х. с соавторами методом секвенирования 16s рРНК показывают, что микробиота ГП носителей КЛ схожа с микробиотой кожи, и в ней преобладают *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Methylobacterium* и *Lactobacillus*, в то время как уровень родов *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, и *Corynebacterium* снижены [32]. Вместе с тем в публикации Андерсона Дж. не обнаружено изменения в микробиоте ГП у носителей КЛ, а источником кератита, ассоциированного с ношением КЛ, считаются комменсальные условно-патогенные микроорганизмы, входящие в состав микробиоты ГП [78]. То есть фактором, способствующим возникновению воспалительных изменений в роговице, могут быть механические повреждения в

эпителии роговицы, появление точечных эрозий и микроповреждений на фоне ношения КЛ.

Исследование микробиоты глазной поверхности при синдроме сухого глаза (ССГ). ССГ — полиэтиологическое и многофакторное заболевание, которое проявляется снижением выработки и повышенным испарением слезной жидкости, нестабильностью слезной пленки. Выделяют два подтипа ССГ: вызванный гипосекрецией водного компонента слезными железами и избыточным испарением, связанным с дисфункцией мейбомиевых желез, что приводит к снижению стабильности слезной пленки из-за недостатка липидного слоя [19]. Также в подгруппе со сниженной продукцией слезной жидкости есть разделение на пациентов с первичным и вторичным синдромом Шегрена и тех, у кого нет этого синдрома [96]. В поиске причин возникновения ССГ ученые поднимают вопрос об изменении микробиоты слизистой оболочки глаза и влиянии дисбиоза на состояние ГП. Так было выявлено, что при ССГ уменьшается количество комменсальных микроорганизмов по сравнению с условно здоровой ГП, но при этом увеличивается количество микроорганизмов, которые не были обнаружены в здоровой когорте [73]. Была установлена разница в микробиальном сообществе ГП в зависимости от подтипа ССГ: для типа с дефицитом слезного компонента было характерно увеличение представленности *Staphylococcus hominis*, в то время как *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus capitis* были более характерны для типа с повышенным испарением слезы. В научной публикации Андерсон Дж. с соавторами, проводя исследование микробиома ГП у пациентов, страдающих ССГ со сниженной секрецией слезной жидкости, выявили снижение разнообразия микробиоты, а род *Bacillus* был идентифицирован как бактериальный биомаркер для пациентов с ССГ [80]. В научной статье, посвященной исследованию микробиома ГП у пациентов с дисфункцией мейбомиевых желез (ДМЖ) методом 16S рРНК, авторы опубликовали следующие результаты: относительная численность бактерий, относящихся к типу Firmicutes и Proteobacteria была значительно выше, а численность Actinobacteria была ниже у пациентов с патологией мейбомиевых желез, чем в контрольной группе. На уровне рода численность *Staphylococcus* и

Sphingomonas у пациентов с ДМЖ была значительно выше, чем в контрольной группе, в то время как численность коринебактерий была значительно ниже. В публикации рассматривали изменение микробиоты ГП больных, перенесших трансплантацию гемопоэтических клеток, среди части которых впоследствии проявилась реакция трансплантата против хозяина (РТПХ) [36]. Такое осложнение проявлялось ССГ разной степени выраженности. Сравнивали испытуемых, перенесших трансплантацию гемопоэтических клеток с возникновением РТПХ и без РТПХ, и здоровую контрольную группу. Было обнаружено, что в группе с РТПХ было статистически значимо больше положительных результатов посева и более разнообразная микробная флора.

К одному из факторов риска развития ССГ относится СД. При СД возникает множество осложнений сосудистого и нейрогенного происхождения. ГП также подвергается изменениям, которые связаны со снижением секреции слезной жидкости, замедлением заживления ран эпителия, уменьшением плотности роговичных нервов, снижением чувствительности роговицы [72]. Основные осложнения СД со стороны роговицы включают диабетическую кератопатию и ССГ. При анализе факторов риска возникновения инфекционных заболеваний роговицы было выявлено, что пациенты с СД больше подвержены возникновению бактериального кератита, в отличие от вирусных, грибковых и акантамебных воспалительных заболеваний ГП [17]. Также проводится изучение изменений в составе микробного сообщества ГП у пациентов с СД. Исследование микробиома ГП методом секвенирования 16S рРНК у пациентов с СД и диагностированным ССГ, показало большее количество оперативных таксономических единиц (ОТЕ) по сравнению с нормой и выявило, что роды *Clostridiales* и *Lactobacillus* входили в основную микробиоту ГП, что не было характерно для условной нормы [79].

Таким образом, при ССГ происходят гетерогенные изменения в составе микробиоты ГП, которые требуют дальнейшего изучения.

1.4. Исследование микробного сообщества глазной поверхности без инфекционного воспаления

1.4.1. Исследование микробного сообщества «здоровой» глазной поверхности культуральным методом

При анализе источников литературы, в которых проводятся исследования микробиоты ГП традиционным культуральным методом, выделенные с образцом микроорганизмы относятся в основном к типам Firmicutes и Actinobacteria и являются грамположительными (Таблица 3). Намного реже встречается бактерии, относящиеся к Proteobacteria и Bacteroidetes. Основные роды бактерий, которые были выделены со здоровой ГП: Staphylococcus, Streptococcus, Bacillus, Micrococcus, Corynebacterium [34, 36, 51, 59, 66, 87, 95]. Также с нормальной ГП были выделены грибы (Таблица 4). Однако в статьях, изучающих микробиоту глаза при ношении КЛ, результаты посева отличаются. Увеличивается доля микроорганизмов, которые относятся к типу Proteobacteria и Bacteroidetes, появляются условно-патогенные роды бактерий: Pseudomonas, Klebsiella, Moraxella, Proteus [39, 62, 78]. В связи со стремительно развивающейся практической офтальмологией и количеством методов коррекции аметропий важным остается вопрос, оказывают ли влияние на состав микрофлоры ГП нарушения рефракции. Кроме этого, не до конца изучено: насколько быстро меняется состав микрофлоры после перехода от контактной коррекции к хирургическим или бесконтактным методам. На каких сроках после отказа от контактной коррекции микробиом можно считать снова «нормальным»?

Отрицательные результаты посевов биологических образцов варьируют в различных источниках (от 1,0 % до 90,0%). Такие результаты могут быть связаны с различной методологией, описанной в научных публикациях. Забор образцов проводится из различных тканей и с поверхности контактировавших с глазом

объектов, а именно: край века, свод конъюнктивы, инфильтрат роговицы, поверхность КЛ, удаленный хрусталик, слезная жидкость и раствор для хранения КЛ. Наибольший процент отрицательных посевов наблюдается при заборе материала непосредственно с поверхности роговицы, конъюнктивы и из слезной жидкости. В этих случаях подавленный рост может быть связан с тем, что ГП постоянно омывается слезной жидкостью, содержащей антибактериальные компоненты, такие как лизоцим, лактоферрин, β -лизин [5]. Этим отчасти также можно объяснить различия в видах и количестве выделенных из образцов бактерий. Количество выделенных видов микроорганизмов на один образец не превышало четырех, однако в большинстве случаев описан мономикробный рост. Очевидно, что культивирование сильно зависит от выбранных сред. Например, в публикации, где используется сердечно-легочный бульон и кровяной агар с 5% овечьей кровью, статистический анализ показал более высокий рост грамположительных кокков в бульоне [51].

Одни авторы помещали забранные образцы сначала в жидкую питательную среду, а затем осуществляли субкультивирование на твердые питательные среды [59, 62, 95]. Другая часть исследователей использовали либо только жидкие, либо только твердые среды для посева.

Таблица 3 – Виды и типы бактерий, выделенные с нормальной глазной поверхности культуральным методом

Грам+/ -	Тип	Род	Вид	Форма	Культуральный метод исследования
Грам +	Firmicutes	Staphylococcus	<i>Sp.</i>	с	[40; 87; 95]
			<i>Staphylococcus aureus</i>	с	[34; 40; 59]
			<i>Staphylococcus epidermidis</i>	с	[34; 36; 59; 66; 70]
			<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	с	[34; 59]
			<i>Staphylococcus warneri</i>	с	[34; 59]
			<i>Staphylococcus sciuri</i>	с	[59]
			<i>Staphylococcus capitis</i>	с	[34]

Продолжение Таблицы 3

			<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	c	[40]
			<i>Staphylococcus pasteurii</i>	c	[34]
			<i>Unspecified CoNS</i>	c	[34; 59]
		Streptococcus	<i>Streptococcus sp.</i>	dc	[87]
			<i>Streptococcus mitis</i>	dc	[59]
			<i>Streptococcus viridans group</i>	dc	[59; 95]
			<i>Streptococcus oralis</i>	dc	[59]
			<i>Streptococcus salivarius</i>	dc	[59]
		<i>Enterococcus sp.</i>	dc	[40]	
		Bacillus	<i>Bacillus sp., spp.</i>	sfb	[40; 59; 87; 95]
			<i>Bacillus cereus</i>	sfb	[59]
<i>Paenibacillus spp.</i>	sfb	[59]			
Грам +	Actinobacteria	<i>Corynebacterium sp.</i>	b	[40; 95]	
		Propionibacterium m	<i>Propionibacterium sp.</i>	b	[95]
			<i>Propionibacterium acnes</i>	b	[36]
		Micrococcus	<i>Micrococcus sp.</i>	c	[87; 95]
			<i>Micrococcus luteus</i>	c	[66]
		Rothia	<i>Rothia kristinae</i>	c	[66]
		Kocuria	<i>Kocuria kristinae</i>	c	[34; 66]
<i>Kocuria rosea</i>	c		[34]		
<i>Gordonia spp.</i>	b	[59]			
Грам -	Proteobacteria	Rhizobium	<i>Rhizobium radiobacter</i>	b	[95]
		Proteus	<i>Proteus penneri</i>	b	[40]
		Escherichia	<i>Escherichia coli</i>	b	[34]
		Morganella	<i>Morganella spp.</i>	b	[59]
			<i>Morganella morganii</i>	b	[40]
		<i>Moraxella sp.</i>	b	[66; 95]	
		Microbacterium	<i>Microbacterium aurum</i>	pb	[59]
		Serratia	<i>Serratia marcescens</i>	b	[59]
		Citrobacter	<i>Citrobacter spp.</i>	b	[40; 59]
<i>Citrobacter freundii</i>	b		[59]		
<i>Brevundimonas spp.</i>	b	[40; 59]			

*c (cocci) - коккоморфные микроорганизмы; dc (diplococci) – диплококки; b (bacilli) – палочковидные с умеренным удлинением, неспорообразующие; sfb (spore-forming bacilli) – палочковидные с умеренным удлинением, спорообразующие; pb (polymorphic bacilli) – палочковидные с умеренным удлинением, не спорообразующие, полиморфные

Таблица 4 – Грибковая флора, характерная для глазной поверхности в норме

Род грибов	*КЛТ	**МГМ
Malassezia	-	[33; 73]
Penicillium	[33; 55; 57]	-
Aspergillus	[24; 33; 55; 57]	[33]
Rhodotorula	[57]	[33]
Scopulariopsis	[57]	-
Candida	[55; 57]	[33]
Isaria	[57]	-
Geotrichum	[57]	-
Papulospora	[57]	-
Gliocladium	[57]	-
Hormodendron	[57]	-
Saccharomyces	[57]	-
Rhizopus	[57]	-
Nigrospora	[55; 57]	-
Phialophora	[33]	-
Trichoderma	[33]	-
Petromyces	-	[33]
Kazachstania	-	[33]
Davidiella	-	[33]
Wallemia	-	[33]
Kabatiella	-	[33]
Cladosporium	[33]	[33]

Продолжение Таблицы 4

Meyerozyma	-	[33]
Alternaria	[55]	[33]
Cephalosporium	[55]	-
Helminthosporium	[55]	-
Harmodendrum	[55]	-
Mucor	[55]	-
Curvularia	[55]	-
Fusarium	[24; 55]	-
Trichosporon	[55]	-
Mycelia	[24]	-
Rhizoctonia	[24]	-

*КЛТ – культуральное исследование; **МГМ – молекулярно-генетические исследования

1.4.2. Исследование микробиологического разнообразия «здоровой» глазной поверхности методами световой микроскопии первичного материала

С давних времен помимо культивирования предпринимались попытки микроскопии мазков соскобов и блоков удаленной ткани в качестве низкоспецифической экспресс-диагностики. Преимуществами данной методики считаются: скорость получения результатов, непосредственный визуальный контроль, относительно несложный процесс пробоподготовки. В настоящее время выделяют 2 основных вида микроскопии: световую и электронную. Световая микроскопия позволяет исследовать морфологические и тинкториальные свойства

микроорганизмов [56]. В основном традиционно используют окраску по Граму, Цилю-Нельсону (выявление кислотоустойчивых микроорганизмов), метенамином-серебра по Гомори, фиксацию раствором гидроксида калия, окрашивание лактофенолом хлопковым голубым [48, 69]. В ряде работ использована микроскопия первичного материала с окрашиванием по Граму при изучении условно нормальной микробиоты ГП и при воспалительных заболеваниях ГП [40, 44]. Таким образом осуществляется визуальный контроль микроорганизмов, колонизирующих ГП или связанных с инфекционным заболеванием роговицы. Однако в основном методы микроскопии используются в исследованиях, направленных на диагностику инфекционных кератитов. В частности, много исследований посвящено оценке применения микроскопического исследования с различными методами окрашивания при грибковых инфекциях роговицы. Оценивается их чувствительность и специфичность, положительная и отрицательная прогностическая ценность при выявлении инфекционного агента. Микроскопическое исследование позволяет визуализировать гифы, мицелий, конидии, грибковые клетки. Также свое применение нашла флюоресцентная микроскопия, в частности окраска калькофлюором белым для визуализации дрожжеподобных и нитевидных грибов, так как он имеет высокую тропность к хитину их клеточной стенки [50]. По визуальным признакам можно определить, к какой группе относятся грибы: нитевидные (гифальные), дрожжи и дрожжеподобные. Чувствительность окрашивания по Граму, окрашивания лактофенолом хлопковым голубым, метода фиксации раствором гидроксида калия и окрашивание калькофлюором белым составила 73-94 %, а специфичность – 84-97 %, положительная и отрицательная прогностическая ценность – 92 и 89%, 89 и 90%, 68,4 и 91,2%, 71,4 и 96,9% соответственно [48, 50, 44, 106]. Несмотря на имеющийся в распоряжении офтальмологов гистохимический аппарат, не удалось найти специальных исследований первичного материала, полученного с условно здоровой ГП, которые были бы проведены методами световой микроскопии.

1.4.3. Изучение нормофлоры глазной поверхности методом сканирующей электронной микроскопии

В офтальмологии классическая СЭМ нашла свое применение в исследовании морфологии и строения тканей на ультраструктурном уровне [54, 88]. Ранее она практически не применялась в диагностике воспалительных инфекционных заболеваний ГП. Это обусловлено тем, что пробоподготовка представляла собой трудоемкий и длительный процесс, включающий в себя работу с токсичными веществами, что вызывало трудности при большом количестве образцов в рутинной практике. Обязательным условием при подготовке образцов для электронной микроскопии ранее являлись фиксация, дегидратация, напыление металла. Относительно недавно была предложена методика контрастирования биологических проб с применением одного из лантаноидов – хлорида неодима [2, 15]. Время пробоподготовки значительно сократилось и составило в среднем 30 минут. Образцы, подготовленные таким образом, отличаются более высокой контрастностью изображений биологических образцов [3].

При исследовании нормофлоры ГП методом СЭМ с «лантаноидным контрастированием» визуализируется довольно высокое разнообразие микроорганизмов [1]. Фенотипически можно выделить коккоморфные, палочковидные микроорганизмы, причем первые чаще аффилированы с клеточной поверхностью кератоцитов. Контрастирование подчеркивает метаболическую активность, функционирование флагеллярных моторов и эффлюкс-систем бактериальных клеток. Хорошо описываются разнообразные признаки примитивных грибов.

1.4.4. Исследование микробиологического разнообразия «здоровой» глазной поверхности молекулярно-генетическими методами

С появлением молекулярно-генетических методов исследования взгляд на микробиальное сообщество локальных участков организма изменился. Появилось понятие микробиом, оно было введено сравнительно недавно, в 2001 г. Это связано с тем, что его исследование возможно только при использовании молекулярно-генетических методов исследования. Микробиом представляет собой совокупность геномов микроорганизмов, составляющих микробиоту. Первое исследование микробиома ГП методом секвенирования рДНК было проведено в 2011г., что расширило представление о микробиальном сообществе ГП, так как количество микроорганизмов, полученное с помощью метагеномного исследования было значительно выше, чем ранее получали с помощью культурального метода [46], что представляется актуальным относительно изучения микробного сообщества глаза, поскольку количество материала для анализа очень ограничено в объеме.

В последнее время неуклонно увеличивается количество научных исследований, которые применяют такие методы, как метабаркодинг гена 16s рибосомальной РНК (рРНК), секвенирование последнего поколения и полимеразную цепную реакцию (ПЦР). При этом в публикациях приводятся разные методики пробоподготовки, модели секвенаторов и информационные платформы для анализа данных. Чаще всего встречается метабаркодинг гена 16s рРНК. Сейчас этим методом активно изучается микробиом здоровой ГП, анализируются причины изменений в локальном микробиальном сообществе [41, 61, 98]. Используя статистическую обработку полученных данных с помощью анализа основных координат, происходит поиск корреляции между микробным составом и разными патологическими состояниями ГП.

Результаты изучения микробиологического разнообразия условно здоровой ГП молекулярно-генетическими методами исследования. В большинстве исследований *Proteobacteria* является основным типом бактерий,

идентифицируемых на ГП молекулярно-генетическими методами и относящихся к грамотрицательным микробам [49, 70, 80]. Реже встречаются Firmicutes, Bacteroidetes и Actinobacteria [34, 93]. Род *Staphylococcus*, который наиболее часто выделяется культуральным методом с ГП, встречается и при культуральнонезависимых методах исследования, но не является доминирующим по сравнению с другими видами.

Среди разных участков слизистых оболочек человеческого организма конъюнктивы и роговица считаются наименее заселенными микроорганизмами. Несмотря на это, проводятся попытки описать основную, или коровую, микробиоту, которая была бы специфична именно для ГП. Однако в имеющихся источниках нет единого мнения не только о составе коровой микробиоты, но и о самом факте ее существования. Так, в части публикаций авторы не находят микроорганизмы, которые были бы идентифицированы среди всех исследуемых, и таким образом приходят к выводу что коровой микробиоты ГП нет [95]. Такой вывод подкрепляется тем, что микробиальное сообщество ГП считается изменчивым, что обусловлено непосредственным взаимодействием с окружающей средой, продукцией слезной жидкости с антибактериальными компонентами, мигательными движениями век.

С другой стороны, часть авторов выделяют основную микробиоту глазной поверхности, для которой определяют следующие специфичные микроорганизмы *Pseudomonas*, *Enhydrobacter*, *Brevibacterium*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Staphylococcus* и *Propionibacterium* [46, 59, 70, 80]. Перечисленные бактерии относятся как к условно-патогенным, так и к характерным для окружающей среды [93]. В другой научной публикации предлагается термин «тип состояния глазного сообщества» в качестве концепции для выделения различных профилей бактериальных сообществ глазной поверхности [53]. Проведенное типирование микробиома здоровой глазной поверхности было основано на его разделении на 9 различных типов, которые отличались по родам и соотношению их распределения.

Так же, как и при культуральном методе исследования на результат молекулярно-генетических методов влияет место забора образцов. Матисяк и

соавторы проводили исследование микробиома условно здорового глаза, разделив исследуемых на 2 группы [34]. У первой группы испытуемых исследование проводилось с роговицы, у второй группы — с конъюнктивы. Было обнаружено, что в роговичном микробиоме преобладали бактерии типа Proteobacteria (преобладающие роды: Alcanivorax, Pseudoalteromonas), а в конъюнктиве — Firmicutes (Staphylococcus).

1.5. Проблемы верификации микробиологического разнообразия разными методами исследования на примере условно нормальной микробиоты глазной поверхности

Перекрестный анализ первичного материала. Наиболее чистым сравнительным экспериментом можно считать исследование биологического материала испытуемого разными методами. Появляется возможность оценить соответствие и различие получаемых результатов. В статьях, посвященных исследованию микробиома условно здоровой ГП одновременно двумя методами (культуральным и молекулярно-генетическим), часто обнаруживается несоответствие получаемых результатов [34, 59, 95]. Это выражается в том, что при перекрестном анализе образцов, полученных от одного исследуемого, молекулярно-генетическими методами идентифицируется более высокое микробиологическое разнообразие микроорганизмов ГП и увеличение доли бактерий, характерных для окружающей среды (вода, почва, растения), ротовой полости, кишечника.

Несоответствие данных, получаемых разными методами исследования, может быть связано с тем, что у каждого есть определенные недостатки. То есть особенности самих методов исследования также обуславливают разницу результатов микробиологических исследований. С помощью культурального метода можно выделить только микроорганизмы, которые были живые на момент

забора материала, при этом достаточно даже одного живого микроорганизма. Однако при заборе биологических проб возможно загрязнение образцов и появление дополнительных загрязняющих микроорганизмов. С другой стороны, существует вероятность того, что микроорганизмы, обитающие на слизистой глаза, могут требовать весьма специфических условий для культивирования и быть трудно культивируемыми в стандартных условиях, что в свою очередь может приводить к ложноотрицательным результатам. К недостаткам же молекулярно-генетических методов исследования относится то, что в результатах отражаются микроорганизмы, которые были неактивны и неживые на момент забора биологического материала, также возможно появление загрязняющих последовательностей в процессе проведения геномного секвенирования, что влияет на достоверность результатов исследования.

Существует очень небольшое количество публикаций, в которых проводится не только забор образцов для посева, но и микроскопия биологического материала. Было обнаружено расхождение результатов при исследовании проб у пациентов с кератитом и дакриоциститом, методом микроскопии визуализировалось большее количество микроорганизмов, тинкториальные и морфологические свойства которых не полностью совпадали с результатами идентификации выделенных микроорганизмов [44]. При изучении условно нормальной микрофлоры ГП чаще всего микроскопические методы исследования не проводятся, поскольку они не дают видového представления о совокупности микроорганизмов ГП и результаты зависят от опыта исследователя. Также ограничением данных методов является возникновение артефактов. Однако визуализирующие методы способны расширить взгляд на микробиоту ГП, поскольку можно обнаружить бактерии, которые трудно поддаются культивированию или исключить микроорганизмы, которые представляют собой результат контаминации образца. В отношении грибковой флоры микроскопические методики также представляют собой ценный инструмент, так как показывают высокую чувствительность и специфичность при исследовании возбудителей кератомикозов. При посеве на селективные питательные среды рост грибов происходит в течение 1–2 недель и требует разных

температурных режимов для филаментозных и дрожжевых грибов, что при исследовании нормофлоры может послужить ограничивающим фактором.

Различие результатов, получаемых на уровне субпопуляции по данным литературы. Более широкий взгляд на расхождение данных можно получить из совокупности источников, в которых уже был предпринят сравнительный анализ на уровне субпопуляции. Так, в большинстве публикаций количество выделяемых микроорганизмов на одного участника составляет не более четырех, но большинство показывают мономикробный рост [34, 59, 62, 95]. Причем большее количество микроорганизмов на одного участника и меньше отрицательных по посеву результатов было в тех исследованиях, где забор биологического материала осуществлялся с КЛ, а не непосредственно с ГП.

В то же время количество различных оперативных ОТЕ на один образец в десятки раз превышает количество выделенных видов из одного образца. ОТЕ представляет собой аналог видовой принадлежности микроорганизмов в культуральнонезависимых исследованиях.

Различия проявляются уже на самом высоком таксономическом ранге – в типовой принадлежности выявляемых микроорганизмов. При культуральном методе это в основном типы Firmicutes и Actinobacteria, а при молекулярно-генетических методах – Proteobacteria и Bacteroidetes. Такие различия могут быть обусловлены тем, что клеточная стенка грамположительных бактерий более устойчивая и прочная, чем у грамотрицательных, что вызывает трудности при извлечении ДНК при метагеномных исследованиях и может приводить к ложному уменьшению количества микроорганизмов, которые относятся к типам Firmicutes и Actinobacteria.

Данные сравнения разных исследований, характеризующие условно нормальную микрофлору ГП, можно обобщить. Чаще всего одновременно разными методами были выделены грамположительные коккоморфные микроорганизмы родов: Staphylococcus, Micrococcus, Kocuria, Streptococcus, Enterococcus; грамположительные спорообразующие бациллы родов Bacillus, Paenibacillus; грамположительные неспорообразующие палочковидные бактерии с включениями

Corynebacterium, без включений *Propionibacterium*, *Microbacterium*; грамотрицательные неспорообразующие палочковидные микроорганизмы *Moraxella*, *Serratia* (табл. 6). Наблюдаются совпадения и по микотической флоре (роды *Malassezia*, *Aspergillus*, *Rhodotorula*, *Candida*) которая также была идентифицирована при использовании культуральнозависимых, микроскопических и метагеномных исследованиях [24, 33, 55, 57, 73].

Потенциальными загрязнителями проб могут быть микроорганизмы, выявляемые только молекулярно-генетическими методами: *Fusibacter*, *Sphingobium*, *Mesorhizobium*, *Herbaspirillum*, *Ottowia*, *Pseudochrobactrum*, *Cohaesibacter*, *Alcanivorax*, *Nitrosomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Mucinivorans*, *Erwinia*, *Salinivibrio*, *Anaerophaga*. Они не были ранее выделены из тканей и слизистых человека, но характерны для окружающей среды.

В данном обзоре практически не затрагивалась тема региональных географических особенностей, возраста и пола, которые не могут не влиять на состав микробиома. Хотя, можно отметить, что в большинстве научных публикаций, где эта проблема поднималась, указывается на то, что пол практически не влияет на состав микробного сообщества ГП. Однако в некоторых публикациях различия описывались, так Шин Х. и соавторы получили следующие результаты: количество микроорганизмов *Acinetobacter* и представителей семейства *Enterobacteriaceae* было увеличено, а количество микроорганизмов *Anaerococcus* было снижено в глазной микробиоте испытуемых женского пола по сравнению с испытуемыми мужского пола [32]. Другие авторы в своем исследовании показали разницу в индексе Шеннона (коэффициент равной представленности разных видов): у мужчин данный показатель был значительно выше, чем у женщин [95]. Также противоречивые результаты касаются положения об изменении микробного сообщества ГП с возрастом. Кавуото К.М. с соавторами выявили значительное снижение микробиологического разнообразия в образцах взрослых по сравнению с образцами детей [49]. Однако у детей наблюдалось значительно более высокое количество уникальных ОТЕ по сравнению со взрослыми. Другие же исследователи пришли к выводам, что с возрастом

происходит увеличение количества микроорганизмов на ГП [87]. Что касается такого фактора, как географическое расположение, то влияние на микробиоту ГП в большей степени оказывают климатические условия и сезонные изменения. В период повышенной влажности снижается количество и разнообразие микроорганизмов по сравнению с периодами низкой влажности [84]. Также в странах с тропическим климатом встречается значительно больше случаев грибкового кератита, что обусловлено благоприятными условиями для их роста [64]. В развитых странах с умеренным климатом изменения микрофлоры ГП обусловлены более высоким уровнем использования КЛ, как метода коррекции аметропии [99].

Как видно на примере микрофлоры ГП нет идеального метода, позволяющего верифицировать данные других методик бактериологического исследования. В настоящем исследовании предложена СЭМ+ЛК [8, 13].

Таблица 5 – Роды бактерий, характерные для нормального микробиома глазной поверхности, идентифицированные разными методами.

Тип	Род	Молекулярно-генетические методы исследования		КЛТ* **
		МТС*	ПЦР**	
Firmicutes	Staphylococcus	[32; 46; 49; 55; 70; 73; 78; 80]	[34]	+
	Bacillus	[53; 70]	-	+
	Parvimonas	[73; 95]	-	-
	Coprococcus	[70]	-	-
	Aerococcus	[32; 53]	-	-
	Ruminococcus	[70]	-	-
	Blautia	[70]	-	-
	Veillonella	[73]	[95]	-
	Streptococcus	[32; 34; 46; 49; 70; 73; 78; 80; 95]	-	+
	Enterococcus	[53]	-	+
	Paeniclostridium	[34]	-	-
	Paenibacillus	[34; 53]	-	+
	Clostridium	[53; 70]	-	-
Fusibacter	[70]	-	-	

Продолжение Таблицы 5

Firmicutes	Lachnoclostridium	[34]	-	-
	Turcibacter	[70]	-	-
	Roseburia	[70]	-	-
	Faecalibacterium	[53; 70]	-	-
	Phascolarctobacterium	[70]	-	-
	Eubacterium	[53]	-	-
	Lactobacillus	[32; 34; 70; 73]	-	-
	Pseudoflavonifractor	[34]	-	-
	Megamonas	[53]	-	-
Actinobacteria	Corynebacterium	[32; 34; 46; 49; 53; 73; 78; 80; 95]	-	+
	Propionibacterium	[46; 49]	[34]	+
	Brevibacterium	[49; 78]	-	-
	Brachybacterium	[49]	-	-
	Nocardia	[34]	-	-
	Cutibacterium	[34; 73; 78; 80]	-	-
	Rothia	[32; 73; 95]	-	+
	Micrococcus	[53; 80]	[34]	+
	Kocuria	[32; 53]	-	+
	Collinsella	[70]	-	-
	Actinomyces	[32; 34]	-	-
	Janibacter	[73]	-	-
	Bifidobacterium	[70]	-	-
	Micropruina	[73]	-	-
	Streptomyces	[34; 53]	-	-
	Schaalia	[73]	-	-
Proteobacteria	Pseudomonas	[32; 46; 53; 70; 78; 80; 95]	-	-
	Moraxella	[34]	[36]	+
	Neisseria	[32; 73]	-	-
	Haemophilus	[32; 73]	-	-
	Aggregatibacter	[73]	-	-
	Paracoccus	[73; 49]	-	-
	Acinetobacter	[32; 34; 46; 53; 70; 73; 78; 80; 95]	-	-
	Vibrio	[70]	-	-
	Sphingobium	[32]	-	-
	Sphingomonas	[46; 53; 95]	-	-
	Methylophaga	[70]	-	-
	Pelomonas	[53]	-	-
	Stenotrophomonas	[53]	-	-
	Enhydrobacter	[78; 80; 95]	-	-
	Ochrobactrum	[53]	-	-
	Sutterella	[53]	-	-
	Massilia	[95]	-	-
	Brevundimonas	[46; 53]		+
	Mesorhizobium	[53]	-	-
	Alcaligenes	[53]	-	-
Herbaspirillum	[34]	-	-	
Ottowia	[78]	-	-	

Продолжение Таблицы 5

Proteobacteria	Escherichia	[34]	-	+
	Pseudochrobactrum	[53]	-	-
	Cohaesibacter	[53]	-	-
	Shewanella	[53]	-	-
	Alcanivorax	[34]	-	-
	Nitrosomonas	[78]	-	-
	Pseudoalteromonas	[34; 70]	-	-
	Diaphorobacter	[78]	-	-
	Erwinia	[70]	-	-
	Salinivibrio	[70]	-	-
	Methylobacterium	[32; 95]	-	-
	Microbacterium	[34; 53]	-	+
	Serratia	[53]	-	+
Bacteroidetes	Chryseobacterium	[53; 73; 80]	-	-
	Paraprevotella	[70]	-	-
	Prevotella	[53; 70; 73]	-	-
	Bacteroides	[53; 70]	-	-
	Parabacteroides	[53]	-	-
	Tenacibaculum	[70]	-	-
	Porphyromonas	[73]	-	-
	Odoribacter	[70]	-	-
	Alistipes	[53]	-	-
	Mucinivorans	[34]	-	-
	Odoribacter	[70]	-	-
	Hymenobacter	[34]	-	-
	Anaerophaga	[34]	-	-
Fusobacterium	Cetobacterium	[70]	-	-
	Fusobacterium	[70; 73]	-	-
	Leptotrichia	[34]	-	-
Cyanobacteria	Cyanothece	[34]	-	-

*МТС - Метагеномное секвенирование; **ПЦР - полимеразная цепная реакция; ***КЛТ – культуральное исследование

«+» - микроорганизмы обнаружены соответствующим методом; «-» - микроорганизмы не обнаружены соответствующим методом

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

2.1. Изображения для описания формальных признаков, присущих микроорганизмам глазной поверхности, и составления атласа-определителя

Из базы снимков, полученных в лаборатории фундаментальных исследований ФГБНУ «НИИГБ им. М.М. Краснова» методом СЭМ+ЛК было отобрано 45 изображений при стандартном разрешении 58,1 nm/px при 1024x718 px и 452 изображений со стандартным разрешением 21 nm/px при 1024x768 px для описания формальных признаков, присущих микроорганизмам и составления атласа-определителя.

На основании данных литературы о наиболее распространенных микроорганизмах ГП в норме и при патологии был выбран перечень видов микроорганизмов для визуализации: *Achromobacter xylosoxidans*, *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus cereus*, *Burkholderia cepacia*, *Corinebacterium diftheriae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rothia mucilaginosa*, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus pneumoniae*, *Candida albicans*, *Mycobacterium abscessus*.

Представленные в базе изображения были ранее получены при визуализации эталонных культур из коллекции микробиологической лаборатории РНИМУ имени Н. И. Пирогова [14]. Для подготовки образцов (с целью формирования базы изображений) клетки из колоний микробных культур суспендировали в растворе Хенкса без фенолового красного в концентрации, соответствующей 1,0 ед. оптической плотности по шкале МакФарланда. По 0,1 мл суспензии наносили на диски из полистирола (диаметр 7 мм). Подготовленную таким образом пробу естественным путем подсушивали в течение 2 минут в стерильных условиях для обеспечения адгезии клеток на поверхности. Сразу же после этого носитель с

адгезированными микробными клетками обрабатывали реактивами из набора для контрастирования BioREE-B в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя (ООО «Глаукон», Россия). Фиксации и обезвоживанию образцы не подвергали. Образцы после лантаноидного контрастирования закрепляли на предметном столике микроскопа посредством адгезивной углеродной ленты (Nisshin EM, Co., Япония) и размещали в камере сканирующего электронного микроскопа (EVO LS 10, Zeiss, Germany). Наблюдение проводили в режиме низкого вакуума при ускоряющем напряжении 20–21 кВ и токе на образце 60–320 пА. Использовали детектор обратно-рассеянных электронов (BSE). Далее полученные изображения микроорганизмов использовали для составления иллюстраций атласа и поиска консервативных признаков с целью выделения морфологических кластеров и групп.

2.2. Клинические группы

В исследовании приняли участие 160 участников, которые были разделены на 3 группы в зависимости от проведенных методов обследования. В первую группу вошло 15 участников, которым были проведены бесконтактная инфракрасная термография (ИКТ) ГП, СЭМ+ЛК и культуральное исследование. В первой группе были выделены подгруппы 1а и 1б, в которые были включены 5 пациентов с условно здоровой ГП и 10 пациентов с кератитом, соответственно. Также ретроспективно были изучены амбулаторные карты участников из первой группы, что позволило выявить наличие у части пациентов нейротрофических нарушений роговицы. Во вторую группу были включены 45 участников, которым были выполнены СЭМ+ЛК и культуральное исследование материала с ГП. Во второй группе были выделены подгруппы 2а и 2б, в которые вошли 15 участников с условно здоровой ГП и 30 участников с кератитом, соответственно. Третья группу

включила в себя 100 пациентов, у которых были выполнены СЭМ+ЛК. В третьей группе были выделены две подгруппы 3а и 3б, в которые вошли 50 участников с условно здоровой глазной поверхностью и 50 участников с кератитом, соответственно.

Клинические характеристики участников первой группы (Таблица 6). В первой группе средний возраст участников составил 39,2 года (22–82), соотношение по полу: мужчин – 7 и женщин – 8. В анамнезе у 2 участников – гипертоническая болезнь, у 1 – ношение КЛ. Один пациент перенес интравитреальное введение ингибиторов ангиогенеза и еще один ЭК+ИОЛ.

Во второй группе средний возраст составил 43,1 года (20–77), соотношение по полу: мужчин – 25 и женщин – 20. В анамнезе у двух участников гипертоническая болезнь, у одного СД и ношение КЛ у трех. У двух пациентов была проведена экстракция катаракты с имплантацией интраокулярной линзы (ЭК+ИОЛ), ещё у двух – КП, у одного – лазерный кератомилез (ЛАСИК).

В третьей группе средний возраст составил 41,3 года (21–84), соотношение по полу: мужчин – 45 и женщин – 55. В группу были включены трое пациентов с гипертонической болезнью и трое пациентов с СД. У девяти пациентов в анамнезе использование КЛ с целью коррекции аметропии. Среди проведенных офтальмологических оперативных вмешательств ЭК+ИОЛ перенесли пять пациентов, КП – трое и ЛАСИК – двое. Также в подгруппу 2б вошли четыре участника с травмой роговицы (трое с окалиной и один инородным телом растительного генеза).

У всех пациентов было получено добровольное информированное согласие на проведение исследования. В перечень критериев были включены: возраст старше 18 лет, получение письменного информированного согласия пациента на участие в исследовании, для подгрупп 1а, 2а и 3а (норма) – пациенты без клинических признаков воспалительных и дистрофических патологий глазной поверхности, для подгрупп 1б, 2б и 3б (патология) – пациенты с воспалительной патологией глазной поверхности (кератит, язва роговицы). Критерии невключения участников в исследование следующие: возраст младше 18 лет; отказ от участия в

исследовании; пациенты, проходящие курс антибактериальной терапии, а также закончившие курс антибактериальной терапии, в том случае если не прошло 14 дней со дня последнего приема антибактериальных препаратов; пациенты, применяющие инстилляциии антисептических или антибактериальных глазных капель в конъюнктивальную полость; наличие противопоказаний для проведения импрессионной пробы – патологические состояния роговицы: десцеметоцеле, перфорация роговицы. Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО ПМГМУ им. И. М. Сеченова Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет).

В ходе исследования проводили следующие методы обследования пациентов: стандартный офтальмологический осмотр, включающий изучение анамнеза, стандартное офтальмологическое обследование: визометрия, периметрия, тонометрия, биомикроскопия, офтальмоскопия и определение чувствительности роговицы при наличии в анамнезе патологии тройничного нерва; культуральный; СЭМ+ЛК, ИКТ.

Таблица 6 – Анамнестические данные участников исследования и распределение их по группам

Группы (к-во глаз)		1 (15)		2 (45)		3 (100)	
Подгруппа (к-во глаз)		1а(5)	1б(10)	2а (15)	2б (30)	3а (50)	3б (50)
Характеристика	Средний возраст	39,2 (22–82)		43,1 (20–77)		41,3 (21–84)	
	Распределение по полу	М – 7; Ж – 8		М – 25; Ж – 20		М – 45; Ж – 55	
	Кератит	-	+	-	+	-	+
	Ношение КЛ	1		3		9	
	Хронические заболевания	ГБ – 2		ГБ – 2; СД- 1		ГБ – 3; СД – 3	
	Хирургические вмешательства	ЭК+ИОЛ – 1 ИВВ ингибиторов ангтогенеза – 1		ЭК+ИОЛ – 2 КП – 2 ЛАСИК – 1		ЭК+ИОЛ – 5 КП – 3 ЛАСИК – 2	
	Травма ГП	-		1		4	
Специальные методы исследования	СЭМ	+		+		+	
	Культуральный метод	+		+		-	
	Термография	+		-		-	

2.3. Алгоритм забора биоматериала (импрессионная цитологическая проба) и пробоподготовки для сканирующей электронной микроскопии

При заборе биологического материала с ГП местную анестезию не проводили поскольку. С помощью дугообразно изогнутого адгезивного стерильного гибкого стекла из полистирола (диаметр 7мм) осуществлялось взятие материала с глазной поверхности. Полученная таким образом импрессионная проба естественно подсушивалась в течение 2 минут в стерильных условиях для обеспечения адгезии клеток на поверхности стерильного носителя. Сразу же после этого носитель с адгезированными микробными и эпителиальными клетками обрабатывался реактивами из набора для контрастирования BioREE-B в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя (ООО «Глаукон», Россия). В начале гибкое стекло из полистирола с биологическим материалом пациента обрабатывалось хлоридом неодима, время экспозиции составляло 10 минут. Затем образец в стерильных условиях подвергался промыванию дистиллированной водой. После этого осуществлялось подсушивание пробы с биологическим материалом пациента в стерильных условиях. После чего образец обрабатывался раствором сульфата свинца, время экспозиции составляло 5 минут. Подготовленная таким образом импрессионная проба с адгезированными клетками повторно промывалась дистиллированной водой и подсушивалась в течение двух минут в стерильных условиях. Фиксации и обезвоживанию образцы не подвергались.

2.4. Алгоритм забора биоматериала для культурального исследования

Забор биологического материала осуществлялся с глазной поверхности путем взятия пробы тупфером (стерильный зонд-тампон, содержащий наконечник

из спрессованных волокон хлопчатника) в зоне бульбарной конъюнктивы последовательно 3 раза. Если у пациента был инфильтрат или язва роговицы, то взятие биологического материала производилось непосредственно с поверхности инфильтрата или с края язвы.

2.5. Сканирующая электронная микроскопия

Образцы препаратов после лантаноидного контрастирования закрепляли на предметном столике микроскопа посредством адгезивной углеродной ленты (Nisshin EM, Co., Япония) и размещали в камере сканирующего электронного микроскопа (EVO LS 10, Zeiss, Germany). Наблюдение вели в режиме низкого вакуума при ускоряющем напряжении 20–21 кВ и токе на образце 60–320 пА. Использовали детектор обратнорассеянных электронов (BSE).

2.6. Культуральный метод исследования

Микробиологическое исследование проводили в соответствии с оригинальным протоколом, который предусматривал выделение чистых культур микроорганизмов на питательных средах при двух температурных режимах (37 °С и 24 °С). Пробирки, содержащие биологический материал пациента в питательной среде обогащения для бактериальной флоры, хранили в двух вариантах температур культивации, так как ряд микроорганизмов присущих глазной поверхности имеют температуру роста ниже 37 °С.

Получение накопительной культуры. Первые две пробы помещали в две пробирки с жидкой средой для бактериальной флоры объемом 2 мл (Becton, Dickinson and Company Sparks, MD 21152 USA; BD BACTEC Standard/10 Aerobic/F Culture Vials), а третью – в пробирку с жидкой средой для грибковой флоры

(DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), Gibco, с пенициллином и стрептомицином). Пробирки с биологическим материалом в питательной среде обогащения для бактериальной флоры хранили в двух вариантах температур: одна – в термостате при 37 °С в течение 2 суток, а другая – при 24 °С в течение 5 суток. Пробирку с биологическим материалом в среде обогащения для грибковой флоры хранили при температуре 24 °С в течение 5 суток.

Высев на твердые питательные среды. Из каждой пробирки со средой обогащения для бактериальной флоры производили посев на 2 чашки Петри: с кровяным агаром и хромогенным агаром UriSelect 4 (Bio-Rad Laboratories, USA). Из пробирки со средой обогащения для грибковой флоры осуществляли посев материала на чашку Петри с хромогенным агаром для грибов Candida (Liofilchem, Chromatic Candida). Затем чашки Петри помещали в температурные условия, соответствующие температурам хранения пробирок с накопительной культурой.

Идентификация. Результаты роста на твердых питательных средах оценивали на 2-й и 5-й день культивирования. Для идентификации микроорганизмов использовали комплекс микробиологических методов, включая микроскопию, биохимические тесты, масс–спектрометрию.

2.7. Термография

Бесконтактная ИКТ проводилась тепловизором Testo 875 (Testo SE &Co. KGaA, Германия) в одинаковых стандартных условиях (температура 24 °С, влажность 50%). Пространственное разрешение термограммы составляло 320×240 пикселей, а температурное – 0,1°С. Исследование проводилось с использованием температурной шкалы с автоматическим распознаванием горячей/холодной точки.

Перед исследованием участник 15 минут находился в помещении для адаптации к условиям. Измерение проводилось при горизонтальном положении обследуемого на кушетке. Тепловизор устанавливался горизонтально на штативе

на высоте 110 см от пола. С помощью камеры инфракрасного излучения прибор определял температуру поверхности путем измерения излучаемой тепловой энергии.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Алгоритм фенотипической идентификации микробиологических объектов, выявляемых на глазной поверхности

По набранной базе эталонных изображений, полученных методом СЭМ+ЛК, был создан рубрикатор микроорганизмов по фенотипическим признакам.

Первая задача при анализе импрессионной пробы биоматериала посредством СЭМ – отнести наблюдаемые объекты к одному из царств: бактерии, грибы и простейшие. В базу вошли царства бактерий, грибов и простейших. На уровне царства определение принадлежности визуализированного объекта производили, основываясь на размерах, контуре оболочек, контрастности.

3.1.1. Царство бактерии

Первым оцениваемым показателем были размеры клеток. Средние размеры бактерий – следующие: длина — 1,5–3 мкм, ширина — 0,4–1,5 мкм. По размеру клетки бактерии меньше размеров клеток грибов и простейших. Также оценивали однообразие, самоподобие визуализированных клеток. Для клеток бактерий характерна более высокая степень самоподобия в паттерне изображения, чем для клеток других инфекционных агентов.

Были проанализированы специфические морфологические признаки бактерий. Основным конституциональным признаком, позволяющим разделить микроорганизмы на группы, оказалась форма микроорганизмов (сферическая, палочковидная или промежуточная). Для деления групп на подгруппы

использовали характеристики контура микроорганизма: его очертания и контрастность по отношению к фону (Таблица 7). Также учитывали такие признаки, как наличие спор, очертания жгутиков, подвижность микроорганизмов. В одной колонии могли присутствовать сразу яркие (метаболически активные) и тёмные (в покоящейся фазе) клетки. Для паттерна поверхности при лантаноидном контрастировании были характерны яркие точки, которые могли быть связаны с активными эффлюкс-системами и активными флагеллярными моторами, действовавшими на момент ЛК биологического материала для СЭМ.

Клетки бактерий можно перепутать с объектами иной природы, не относящимися к микроорганизмам такими как шарики эмульсии липидов, фосфатные обособления в ткани и т. п. Ряд этих объектов хорошо контрастируется хлоридом неодима и ацетатом свинца и дают ощущение «поднятого» при окрашивании ложного метаболически-активного объекта.

Еще раз стоит подчеркнуть, что двумя основными признаками бактерий при применении СЭМ и лантаноидного контрастирования будут: очень высокая степень самоподобия «визуального» паттерна, соответствующего клеткам в группе, и размеры клеток. Единичный объект, обнаруженный в пробе и удовлетворяющий признакам какой-либо бактерии, не может рассматриваться как достоверно идентифицированный.

На основании найденных на изображениях фенотипических признаков была построена рубрикация бактерий в рубрикаторе-определителе.

К группе конституциональных кокков можно отнести *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* и *Rothia mucilaginosa*. Вне фазы деления кокки – это клетки исключительно сферической формы размером 0,5–0,9 мкм. Как правило, они яркие, но в колонии могут присутствовать и тёмные не активные индивиды (Рисунок 1). Последнее характерно при начале лечения антибиотиками и антисептиками до момента забора пробы. Кокки легко узнаваемы по характерным паттернам, возникающим при делении (поперечная мембрана). При определенных фазах развития или при негативном воздействии очень характерны крупные яркие зоны на поверхности клеток, соответствующие функционирующим эффлюкс-

системам. Часто эти зоны явно проминируют относительно поверхности бактерии. Докрашивание пробы свинцом или висмутом не приводит к появлению на изображении внешней оболочки или капсулы вокруг клеток. *Staphylococcus epidermidis* статистически крупнее и занимает свободное положение в пробе, что подчеркивает его случайный характер на ГП. *Staphylococcus aureus* ассоциирует с поверхностью запустелых эпителиальных клеток роговицы.

В первую очередь среди бактерий промежуточной формы стоит рассмотреть конституциональных диплококков с выраженной двойной или одинарной оболочкой (Рисунок 2), к которым можно отнести *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*. Грамположительные диплококки имеют овальную или ланцетоподобную форму. Часть представителей рода образуют капсулу, которая хорошо визуализируется на снимках в виде двойного окрашивания. Спор не образуют и жгутиков не имеют, неподвижные. Могут выстраиваться в цепочки. На снимках у части пневмококков визуализируются внутриклеточная перегородка, что свидетельствует о процессе деления клеток. Размеры следующие: длина — 0,8–2,5 мкм и ширина — 0,8–1,0 мкм.

Колониальные коккобациллы (*Acinetobacter baumannii*) представляют собой короткие (Рисунок 3), почти круглые палочковидные (коккобациллы) бактерии, не образующие спор. Размеры их в среднем следующие ширина — 1,0–1,5 и длина — 1,5–2,0 мкм. Бактерии данного рода не имеют жгутиков, передвижение осуществляется за счет пилей IV типа. Способны синтезировать биопленку, которая является одним из факторов антибиотикорезистентности. На снимках клинических проб основное вещество биопленки, покрывающее бактерии, часто выглядит контрастнее самих микроорганизмов. На снимках визуализируются яркие контрастирующие точки, которые маркируют эффлюкс систему (мембранные белковые комплексы, функционирующие как молекулярные насосы). Также можно отметить, что между клетками бактерий осуществляется межклеточный обмен, так как граница между ними более ярко контрастируется благодаря белкам межклеточного взаимодействия. Некоторые клетки находятся в

процессе деления, перед делением визуализируется биполярное окрашивание. Трудность дифференциального определения может возникать при сравнении с подгруппой палочковидных бактерий с размытыми контурами. Действительно, несмотря на отсутствие жгутиков, *Acinetobacter* склонен при ЛК проявлять некоторую размытость контура за счет «слизистости». Это делает его похожим на короткий вариант *Escherichia coli* (*peritrichous*); *Salmonella enterica* (*peritrichous*).

К подгруппе палочковидных бактерий с размытыми контурами внешних оболочек можно отнести жгутиконосцев (*peritrichous*) *Achromobacter xylosoxidans* (*peritrichous*, Рисунок 4); *Escherichia coli* (*peritrichous*, Рисунок 5); *Salmonella enterica* (*peritrichous*, Рисунок 6); *Serratia marcescens* (*peritrichous*, Рисунок 7). Для данной подгруппы микроорганизмов характерным паттерном явилось нечеткость границ бактериальных клеток. Это обусловлено тем, что по всей поверхности клеток располагаются жгутики, служащие для передвижения бактерий, их окрашивание приводит к неравномерному контрастированию клеточных границ. Обычно бактерии расположены в виде скоплений, иногда могут быть расположены по одному или попарно. Окрашивались клетки бактерий неоднородно, на снимках визуализировали более и менее яркие микроорганизмы.

К подгруппе бактерий без жгутиков, с полярными жгутиками были отнесены следующие виды – *Klebsiella pneumoniae*; *Shigella sonnei*; *Stenotrophomonas maltophilia*. Для *Klebsiella pneumoniae* (Рисунок 8) было характерно образование капсул. На снимках визуализировали двойные контуры бактериальных клеток, обусловленные наличием капсулы. Располагались микроорганизмы одиночно, попарно и в виде скоплений. Некоторые бактерии имеют одну крупную яркую точку, которая, вероятно, представляет собой эффлюкс-систему. Между капсулами бактерий определяются яркие межклеточные контакты, свидетельствующие об активном взаимодействии между микроорганизмами. Также для них характерно био пленкообразование, способны быстро синтезировать матрикс. Вид *Shigella sonnei* (Рисунок 9) на снимках СЭМ визуализировали в виде скоплений палочковидных микроорганизмов, не образующих спор. При этом границы между клетками размыты, межклеточные контакты слабо визуализировались.

Основываясь на визуальных данных, неоднородность клеточных границ сопоставима с видами *Salmonella enterica* и *Serratia marcescens*. Клетки бактерий вида *Shigella sonnei* контрастировались однородно, их размеры в среднем составляли ширина – 0,4-0,6 мкм и длина 2,0-2,5 мкм. Представители вида *Stenotrophomonas maltophilia* (Рисунок 10) характеризовались меньшими размерами шириной – 0,4-0,5 мкм и длиной – 0,7-2,0 мкм. Также их характерной особенностью при визуализации на СЭМ явилась веретеновидная форма палочек, отсутствие спор и капсулы. Контрастировались клетки бактерий неоднородно, часть представителей была более контрастной и находилась в процессе деления.

К подгруппе палочковидных бактерий с четкими контурами внешних оболочек без полярных депозитов и/или корд-фактора можно отнести *Moraxella catarhhalis* (Рисунок 11), *Burkholderia cepacia* (Рисунок 12) и *Pseudomonas aeruginosa* (Рисунок 13). Это наиболее часто встречающийся фенотип бактерий. Клетки таких бактерий склонны образовывать группы, но в клинических образцах могут занимать и изолированную позицию. Поперечные размеры составляют от 0,25 до 0,9 мкм. Продольные размеры в этой подгруппе не являются диагностическим признаком. В экстремальных условиях могут менять удлинение от 1:1,5 до 1:7,5. Бактерии рода *Moraxella* более склонны к удлинению, хотя в целом этот параметр остается сильно более устойчивым, чем у перитрихов. Для всех бактерий подгруппы характерна небольшая изогнутость клеток, причем радиус изогнутости весьма выдержан в колонии и не изменяется от организма к организму, несмотря на изменение продольного размера.

При окрашивании лантаноидами (и докрашивании свинцом) визуализируемый паттерн поверхности для отдельной колонии или фазы развития одинаков для всех организмов. Исключение составляют яркие индивиды, окрашивание которых произошло сразу после фазы деления (ювенильная форма). С этим свойством группы может быть связана ошибка, когда в монокультуре или при монобактериальном поражении исследователь попытается выделить два возбудителя вместо одного. Однако распознать их принадлежность к генеральному штамму можно, учитывая их меньший размер, чем у остальных бактерий. Как

правило, докрашивание висмутом не приводит к появлению внешней видимой оболочки у бактерий в этой группе, но могут быть исключения. Эффлокс-системы очень тонкие, множественные, проявляются в клетках при длительной экспозиции электронным пучком на 20 кВ.

В этой группе паттерн часто может служить достаточным признаком для предположительной диагностики до рода. Например, для *Pseudomonas aeruginosa* чрезвычайно характерно возникновение двухзональной окраски с продольной изогнутой границей (типа сильно вытянутого искаженного символа «инь-янь» или «каное») с полностью окрашенными окончаниями, соединенными тонкой яркой зоной). Такой паттерн еще может быть характерен для бактерий рода *Salmonella*, которые можно отличить от *Pseudomonas* по размытости контура, окружающей слизи, множественным точкам у основания флагелл и наличию псевдопрямоугольных окончаний, связанных с непрямой визуализацией множественных жгутиков. При негативном воздействии бактерии этой группы становятся яркими, похожими на рисовые зерна, и теряют изогнутость. Еще одна групповая особенность – следующая: при длительной экспозиции содержимое клеток может образовывать кавитационный пузырек, который можно принять за споры.

Организмы рассматриваемой подгруппы характерны, как для паталогических состояний глаза, так и в качестве участника нормальной микрофлоры ГП.

К бактериям без жгутиков, с полярными депозитами и/или корд-фактором можно отнести *Corynebacterium*. Одной из основных характеристик этого рода являются биполярно расположенные внутриклеточные хранилища комплексного неорганического полифосфата — волютинина (состоит из полиметафосфатов). При окрашивании BioREE-B вследствие связывания фосфатных остатков с неодимом такие локусы обладают повышенной яркостью на изображениях в обратно-рассеянных электронах. Однако не все представители рода *Corynebacterium* могут обладать зернами волютинина. Часть представителей рода могут образовывать корд-фактор (фактор жгутообразования), который представлен миколовыми кислотами (коринемиколатами), основой его является токсичный гликолипид — 6,6-

димиколат трегалозы. Корд-фактор оказывает токсическое действие на ткани, а также блокирует окислительное фосфорилирование в митохондриях макрофагов (защищает от фагоцитоза). Корд-фактор прекрасно визуализируется методом СЭМ+ЛК как сеть тонких ярких волокон (Рисунок 14). Клетки могут располагаться одиночно, попарно, в виде римских цифр V или X, под острым или прямым углом по отношению друг к другу, что объясняется своеобразным типом деления клеток путем излома, образуют скопления. Размеры в среднем следующие: длина — от 1,5 до 2,5 мкм, ширина — от 0,5 до 0,8 мкм.

К группе палочковидных бактерий с умеренным удлинением спорообразующим можно отнести *Bacillus cereus*. На снимках визуализируются характерные для данного рода бактерий эндоспоры (Рисунок 15), которые расположены центрально или субтерминально, у некоторых бактерий визуализируется сразу несколько эндоспор. Эндоспоры имеют круглую форму и менее контрастны, чем сами микроорганизмы. Отличительной особенностью внутриклеточных спор является их способность к тепловому расширению при сканировании электронным пучком, вследствие чего они темнеют, увеличиваются и деформируют бактериальную клетку непосредственно во время анализа. Средний размер данных бактерий следующий: ширина — 1,0–1,2 мкм и длина — 3,0–5,0 мкм. Расположены бактерии в виде цепочек или штакетообразных скоплений.

К группе экстремально удлинённых и нитевидных бактерий были отнесены представители вида *Mycobacterium abscessus*. Бактерии данного вида визуализировали в виде тонких длинных палочек, длина которых доходила до 4-4,5 мкм, ширина при этом составляла 0,4 мкм (Рисунок 16). При этом помимо удлинённых бактерий на снимках СЭМ определялись индивиды, длина которых составляла 2,0-2,5 мкм.

Таблица 7 – Рубрикатор

<p>I. ГРУППА КОККОМОРФНЫХ БАКТЕРИЙ(с)</p> <p>I.1 Конституциональные кокки</p> <p><i>a. Staphylococcus aureus; б. Staphylococcus epidermidis; в. Rothia mucilaginosa</i></p>
<p>II. ГРУППА БАКТЕРИЙ ПРОМЕЖУТОЧНОЙ ФОРМЫ (КОККОБАЦИЛЛЫ И ПОЛИМОРФНЫЕ)</p> <p>II.1 Подгруппа бактерий с округлыми очертаниями полярных окончаний</p> <p>II.1.1 Конституциональные диплококки, с выраженной двойной или одинарной оболочкой</p> <p><i>a. Streptococcus salivarius, Streptococcus mutans, Streptococcus sanguis, Streptococcus mitis</i></p> <p>II.1.2 Колониальные коккобациллы (cb)</p> <p><i>a. Acinetobacter baumannii</i></p> <p>II.2 Подгруппа бактерий с ланцетовидными очертаниями полярных окончаний</p> <p>II.2.1 Конституциональные диплококки, с выраженной двойной оболочкой (dc)</p> <p><i>a. Streptococcus pneumoniae</i></p>
<p>III. ГРУППА ПАЛОЧКОВИДНЫХ БАКТЕРИЙ С УМЕРЕННЫМ УДЛИНЕНИЕМ БЕЗ ОБРАЗОВАНИЯ СПОР (b)</p> <p>III.1 Подгруппа палочковидных бактерий с размытыми контурами внешних оболочек</p> <p>III.1.1 Жгутиконосцы (peritrichous)</p> <p><i>a. Achromobacter xylosoxidans (peritrichous); б. Escherichia coli (peritrichous); в. Salmonella enterica (peritrichous); г. Serratia marcescens (peritrichous);</i></p> <p>III.1.2 Без жгутиков, с полярными жгутиками</p> <p><i>a. Klebsiella pneumoniae; б Shigella sonnei, в. Stenotrophomonas maltophilia (polar)</i></p> <p>III.2 Подгруппа палочковидных бактерий с четкими контурами внешних оболочек</p> <p>III.2.1 без полярных депозитов и/или корд-фактора</p> <p><i>a. Moraxella catarhhalis; б. Burkholderia cepacia (polar); в. Pseudomonas aeruginosa (polar)</i></p> <p>III.2.2 Без жгутиков, с полярными депозитами и/или корд-фактором</p> <p><i>a. Corinebacterium difthereae</i></p>

Продолжение Таблицы 7

**IV. ГРУППА ПАЛОЧКОВИДНЫХ БАКТЕРИЙ С УМЕРЕННЫМ
УДЛИНЕНИЕМ СПОРООБРАЗУЮЩИЕ (sfb)**

Bacillus cereus

**V. ГРУППА ЭКСТРЕМАЛЬНО УДЛИНЕННЫХ И НИТЕВИДНЫХ
БАКТЕРИЙ (lb)**

Mycobacterium abscessus

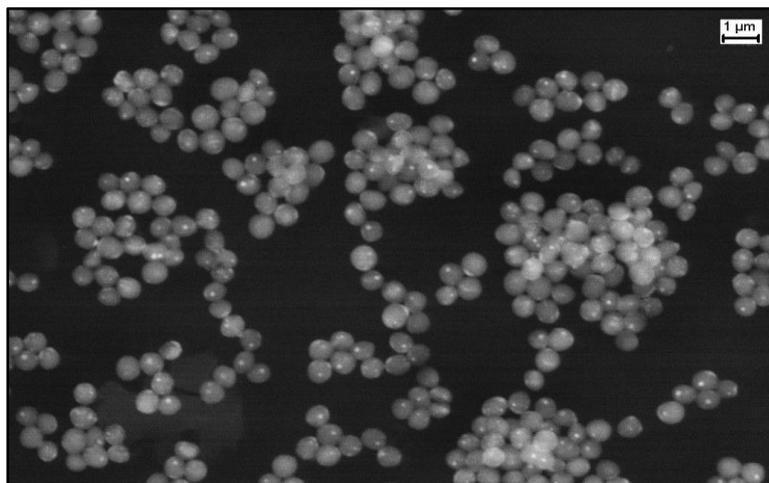


Рисунок 1 – СЭМ изображение участка поверхности пластикового носителя, заселенного эталонной культурой *Staphylococcus epidermidis*

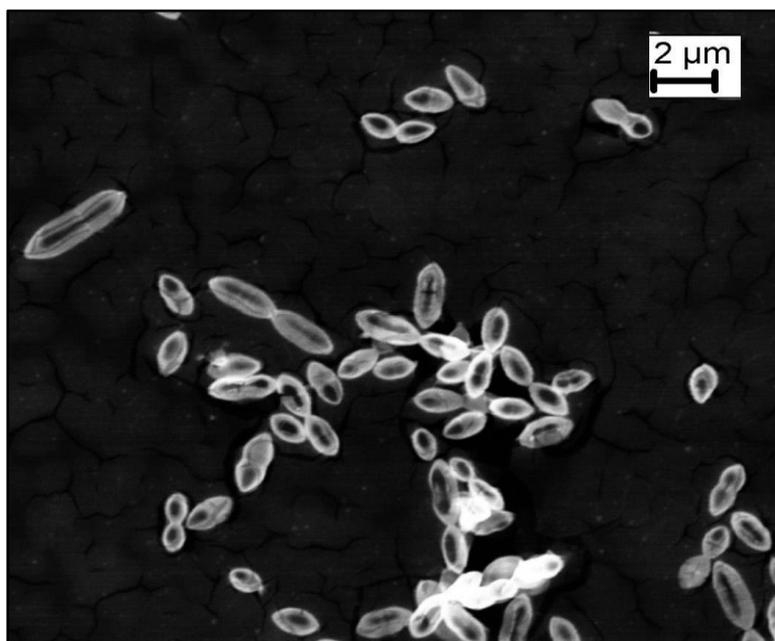


Рисунок 2 – СЭМ изображение участка поверхности пластикового носителя, заселенного эталонной культурой *Streptococcus salivarius*

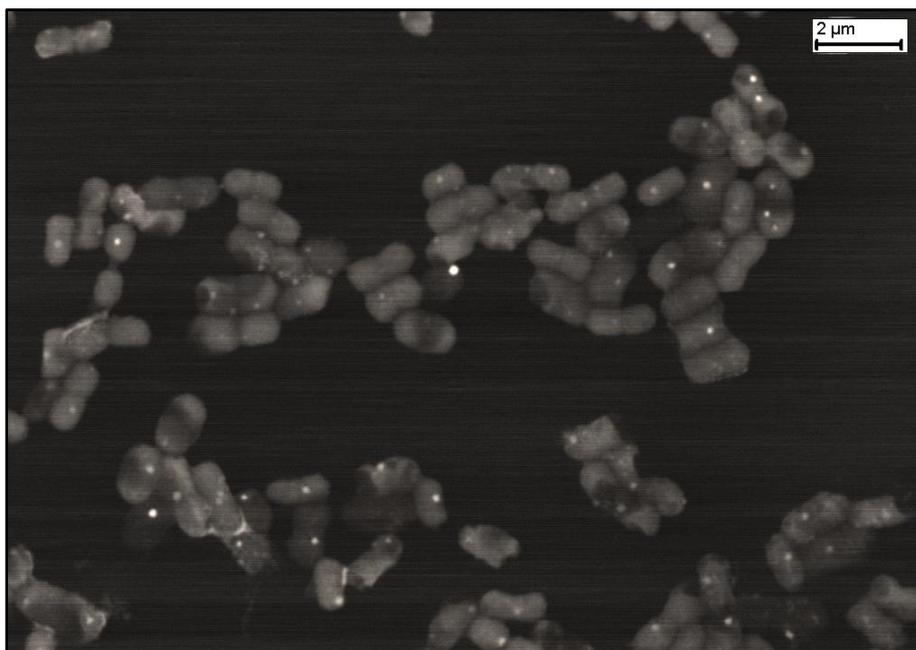


Рисунок 3 – СЭМ изображение участка поверхности пластикового носителя, заселенного эталонной культурой *Acinetobacter baumannii*

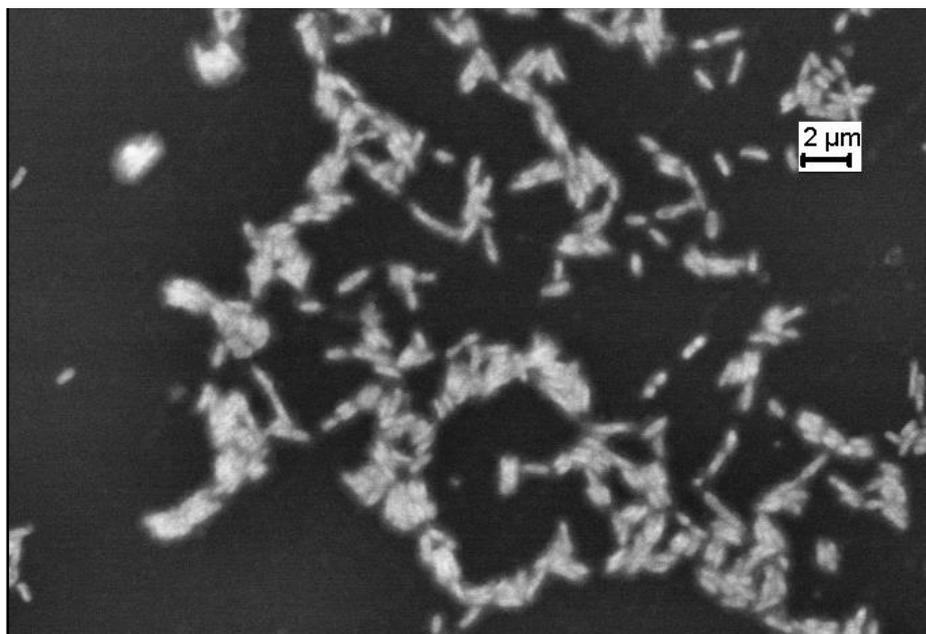


Рисунок 4 – СЭМ изображение участка поверхности пластикового носителя, заселенного эталонной культурой *Achromobacter xylosoxidans*

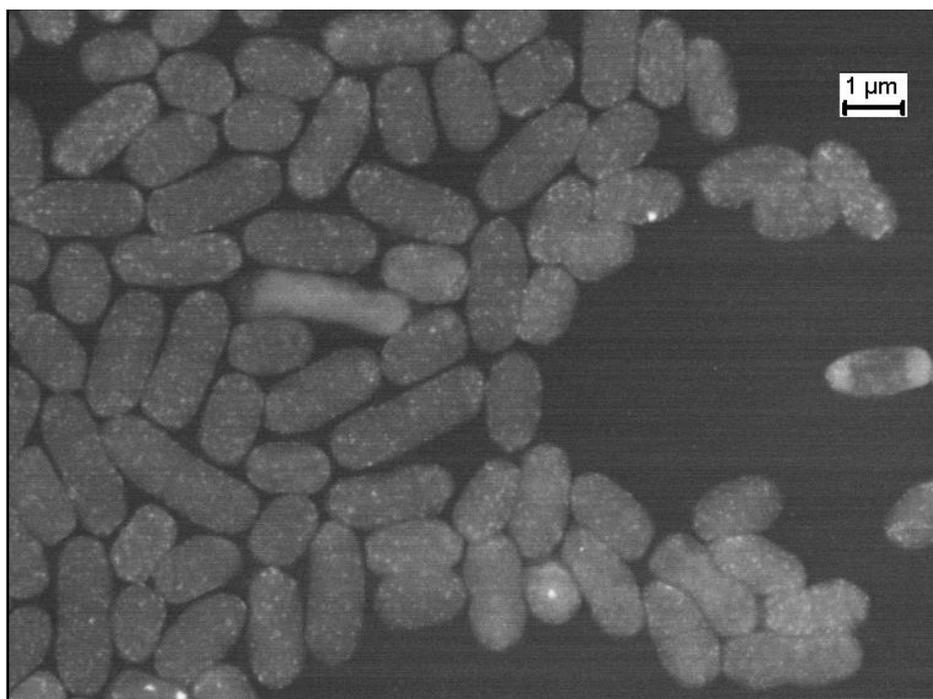


Рисунок 5 – СЭМ изображение участка поверхности пластикового носителя, заселенного эталонной культурой *Escherichia coli*

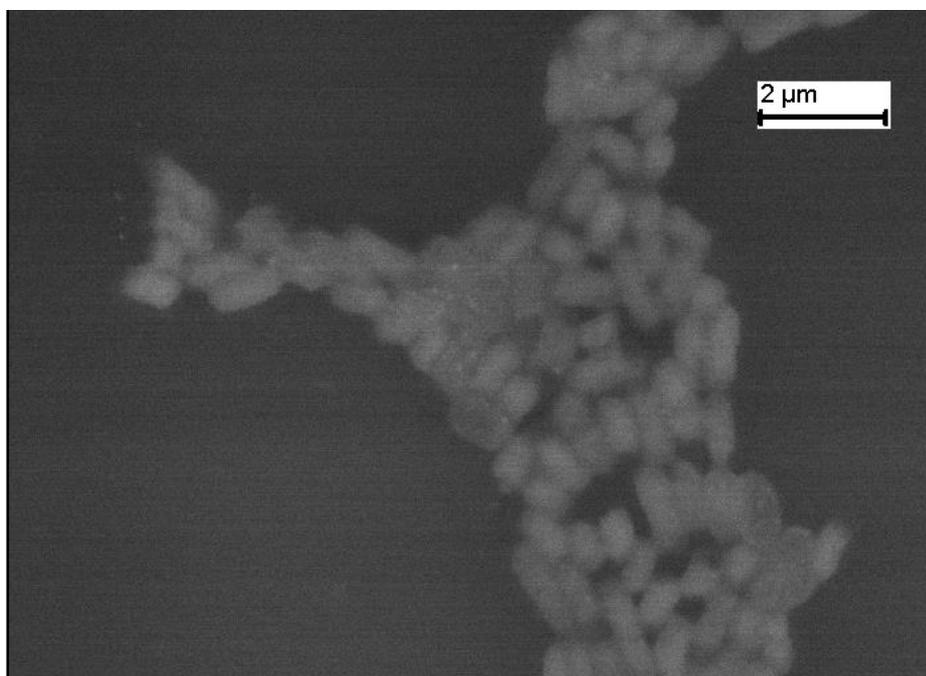


Рисунок 6 – СЭМ изображение участка поверхности пластикового носителя, заселенного эталонной культурой *Salmonella enterica*

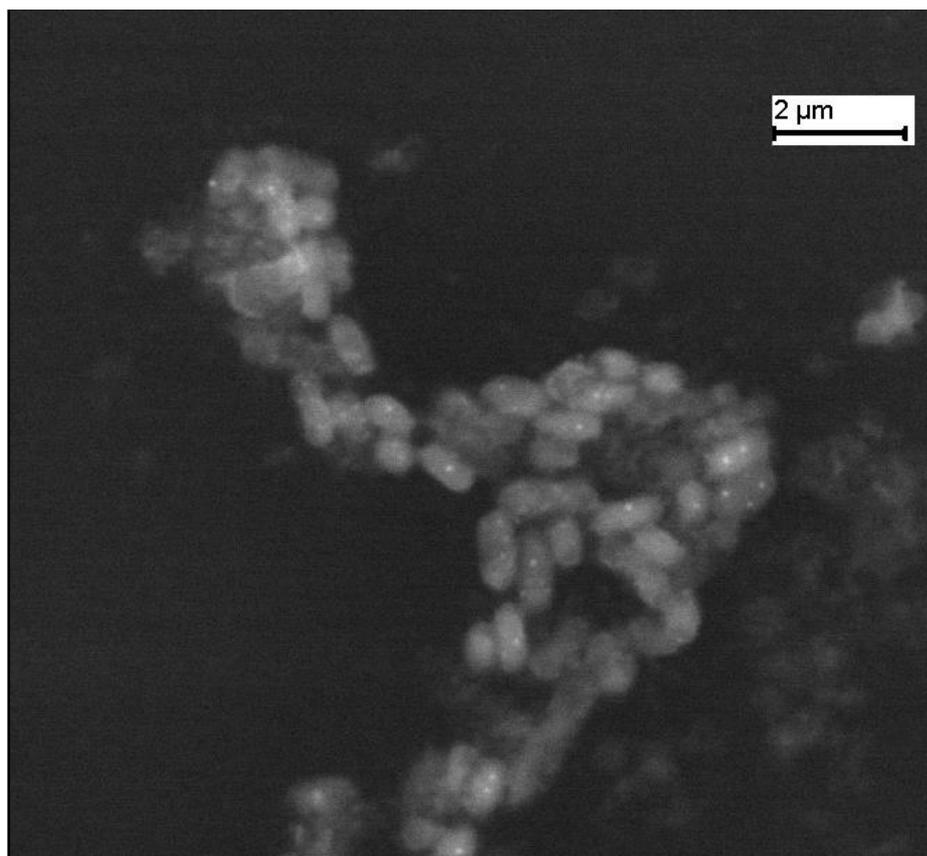


Рисунок 7 – СЭМ изображение участка поверхности пластикового носителя, заселенного эталонной культурой *Serratia marcescens*

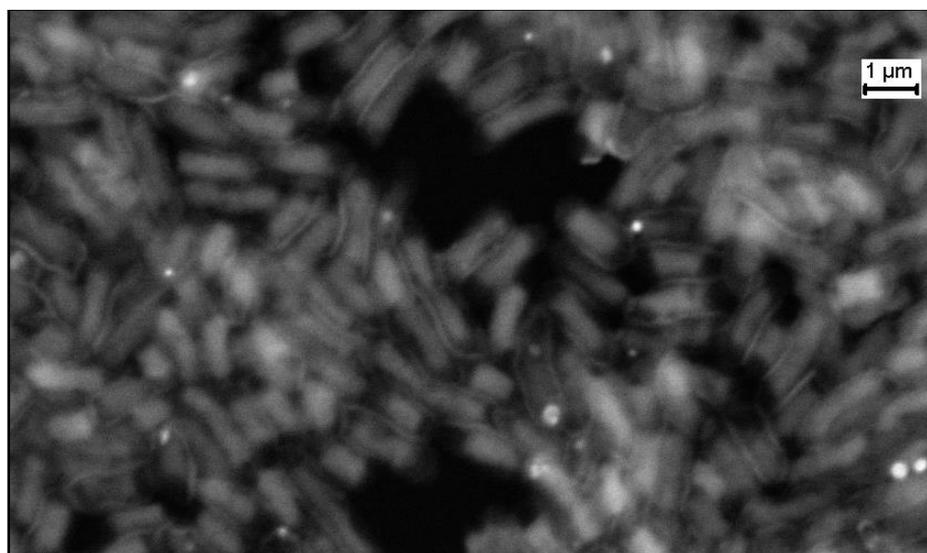


Рисунок 8 – СЭМ изображение участка поверхности пластикового носителя, заселенного эталонной культурой *Klebsiella pneumoniae*

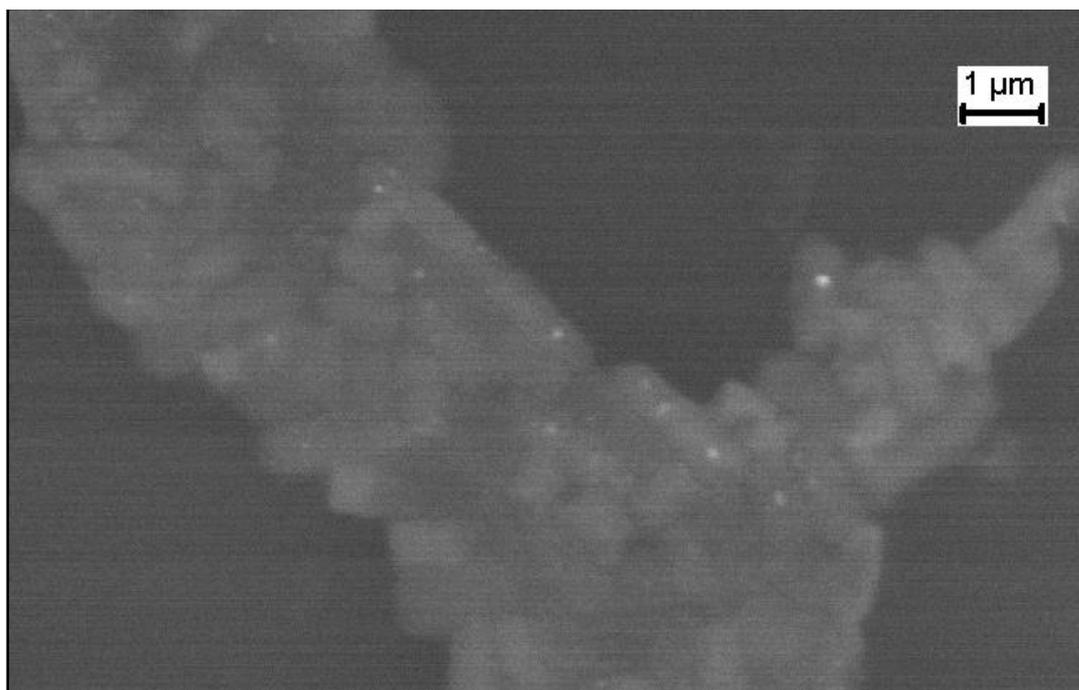


Рисунок 9 – СЭМ изображение участка поверхности пластикового носителя, заселенного эталонной культурой *Shigella sonnei*

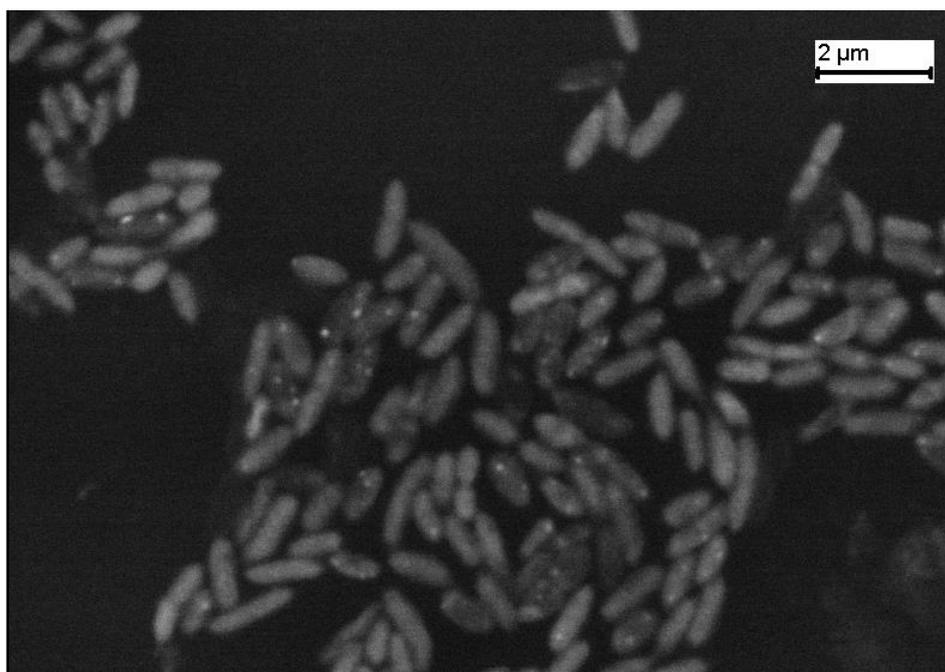


Рисунок 10 – СЭМ изображение участка поверхности пластикового носителя, заселенного эталонной культурой *Stenotrophomonas maltophilia*

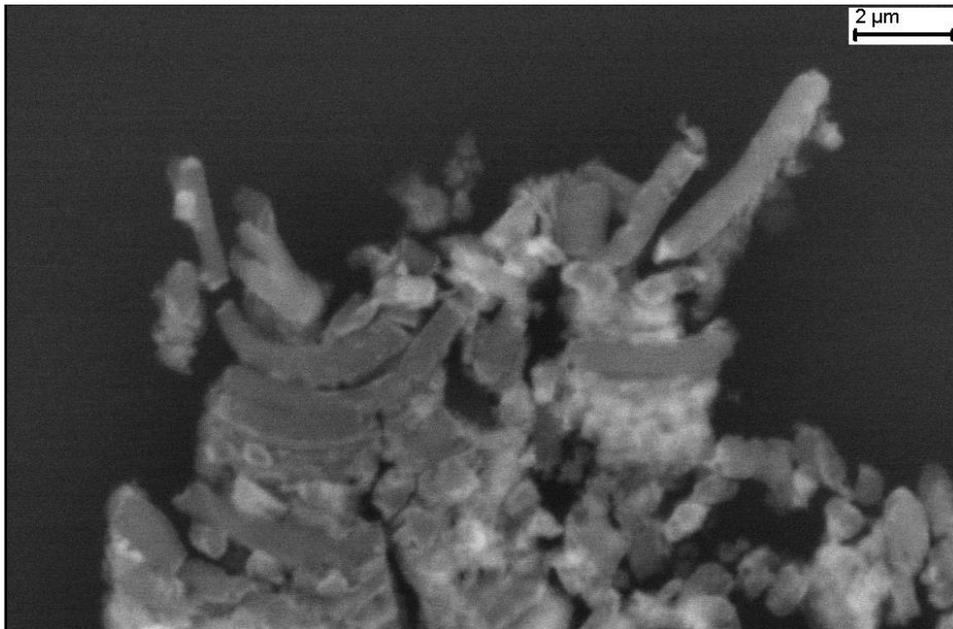


Рисунок 11 – СЭМ изображение участка поверхности пластикового носителя, заселенного эталонной культурой *Moraxella catarrhalis*

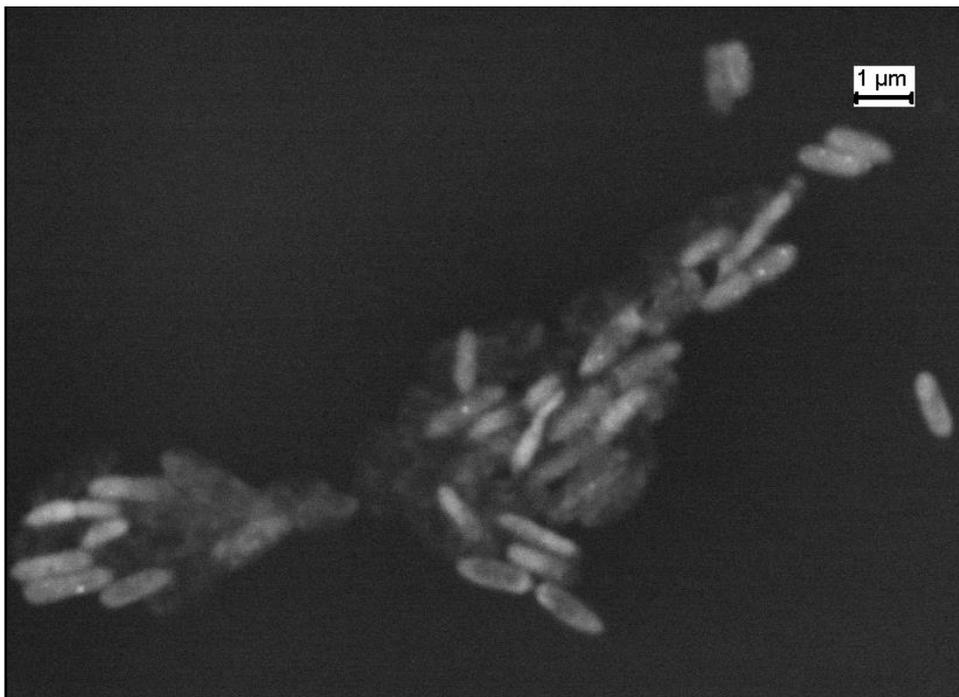


Рисунок 12 – СЭМ изображение участка поверхности пластикового носителя, заселенного эталонной культурой *Burkholderia cepacia*

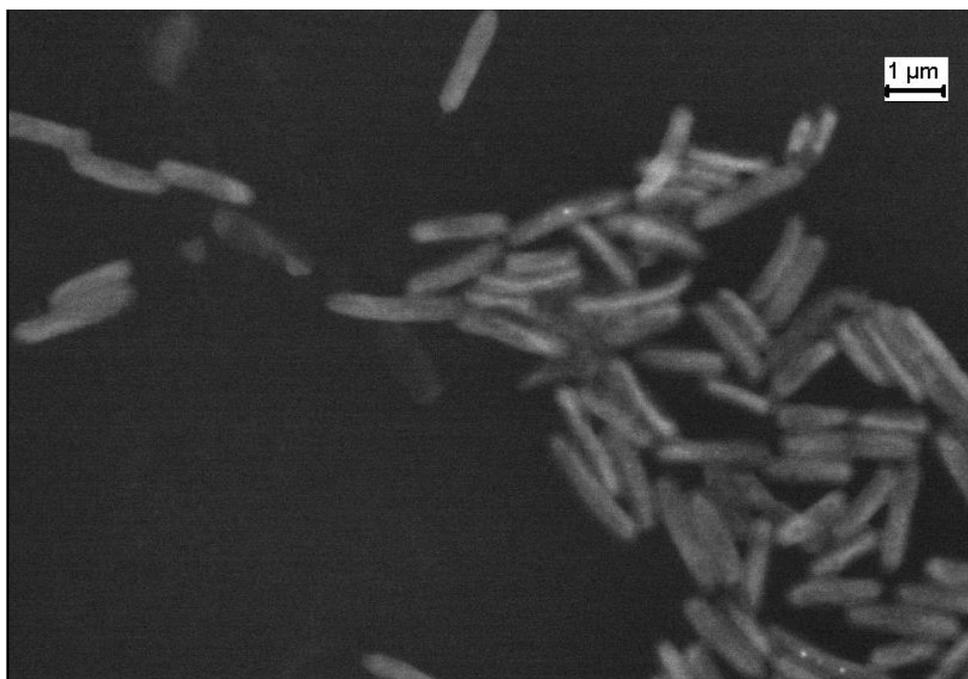


Рисунок 13 – СЭМ изображение участка поверхности пластикового носителя, заселенного эталонной культурой *Pseudomonas aeruginosa*

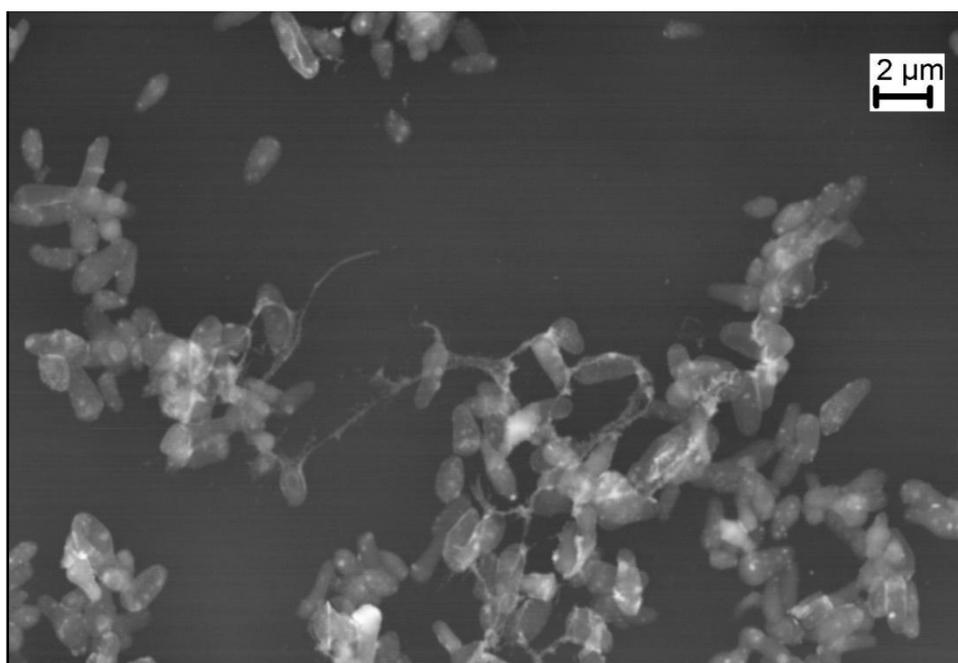


Рисунок 14 – СЭМ изображение участка поверхности пластикового носителя, заселенного эталонной культурой *Corinebacterium difthereae*

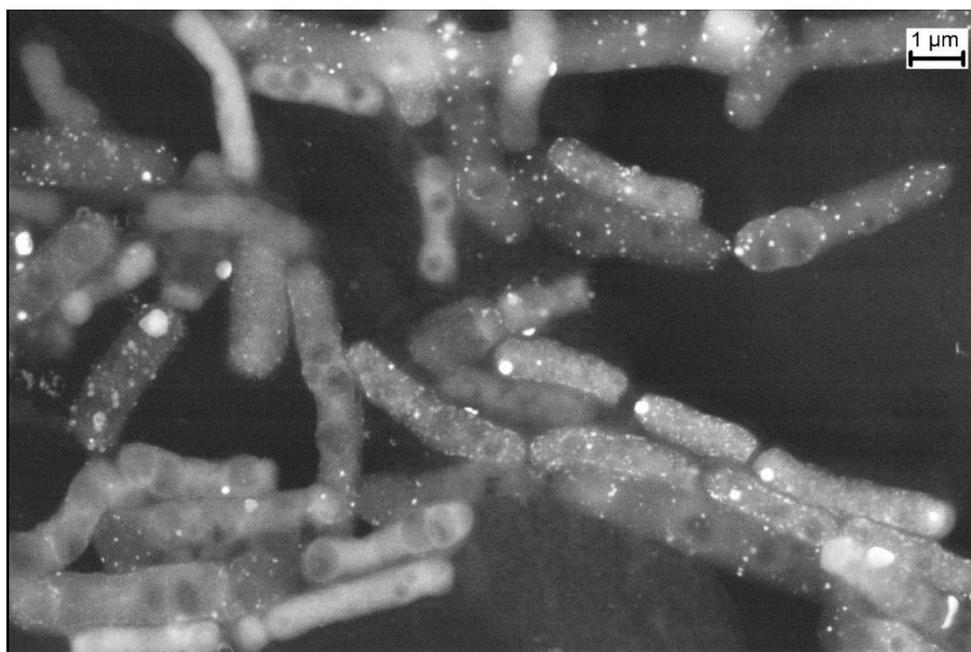


Рисунок 15 – СЭМ изображение участка поверхности пластикового носителя, заселенного эталонной культурой *Bacillus cereus*

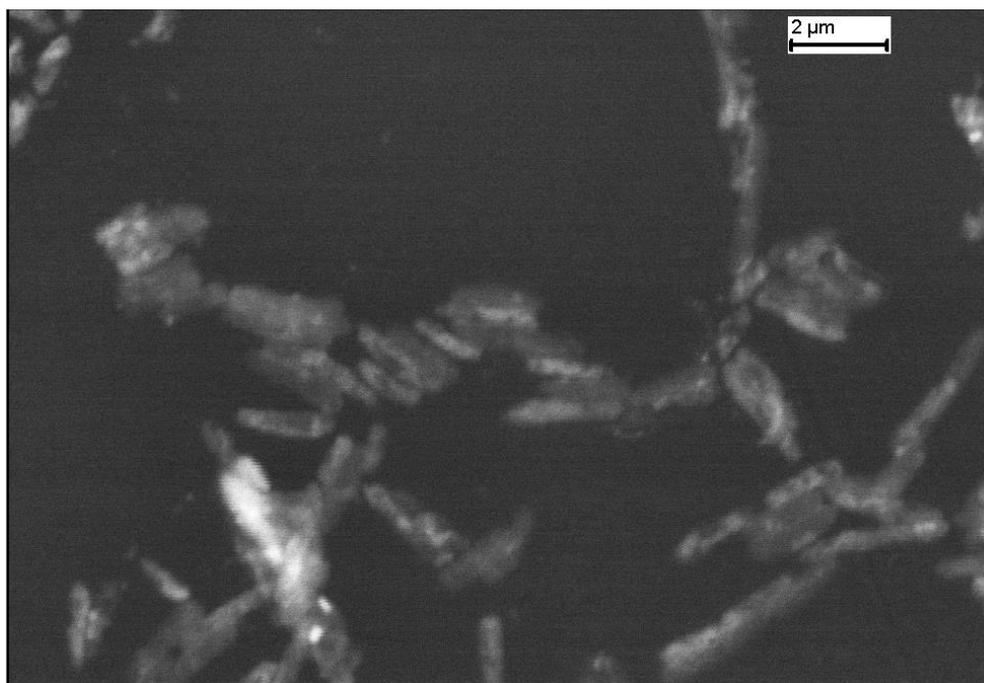


Рисунок 16 – СЭМ изображение участка поверхности пластикового носителя, заселенного эталонной культурой *Mycobacterium abscessus*

3.1.1. Царство грибы

Грибы по морфологическим признакам разделены на 2 типа: дрожжи (и дрожжеподобные) и гифальные. Это разделение основано на том, из каких клеток состоит тело гриба(мицелий). Мицелий может состоять из тонких ветвящихся нитей (гиф), который может быть септированным (гифы разделены перегородками и имеют общую оболочку) и несептированным (представлен разветвлениями одной гифы без перегородок). У дрожжеподобных грибов мицелий состоит из клетки, однако они могут образовывать псевдогифы и псевдомицелий, состоящий из цепочки удлинённых клеток.

В структурах глаза, при микотическом поражении возможно появление грибов с гифальным ростом, в том числе с плодовыми телами (Рисунок 17), и дрожжеподобной формы. При гифальном росте диагностика, как правило, не вызывает никаких затруднений. Очень редко единичные гифы можно принять за запустевший капилляр или белковый тяж. Но при обильном развитии патогена воспроизводимость паттерна является надёжным признаком. Толщина гифа – от 0,3 мкм (редко) до 1,2 мкм. Дрожжеподобные клетки имеют размер от 1,5 мкм до 9–10 мкм (Рисунок 18). Форма их колеблется от правильной сферической, до каплевидной, чечевицеобразной, овальной, неправильной, со сглаженными очертаниями. В отличие от бактерий грибы обладают значительным разнообразием форм индивидуальных клеток в колонии. Для клеток некоторых видов характерно наличие крупных ярких и тёмных областей в пределах одной клетки. У крупных разновидностей можно найти спавшиеся обезвоженные клетки, похожие на «сдувшийся мячик». Дрожжеподобные клетки грибов в ряде случаев тяжело отличить от цист простейших, от воспалительных клеток человека и форменных элементов крови. Также при проведении импрессионных проб непосредственно с ГП нередки случаи появления изолированных клеточных ядер, вышедших из разрушенных эпителиальных клеток. Это один из наиболее схожих объектов, появление которого может усложнить диагностику неопытному специалисту. Ещё

одно распространенное осложнение при диагностике: ядрышки воспалительных клеток можно спутать с группой клеток грибов, склонных делиться на компактные группы по типу: «1-(2)-4». Воспалительные клетки человека в отличие от грибов характеризуются наличием темной цитоплазмы, окружающей ядро с яркими ядрышками, и тонкого внешнего контура, соответствующего окрашенной мембране.

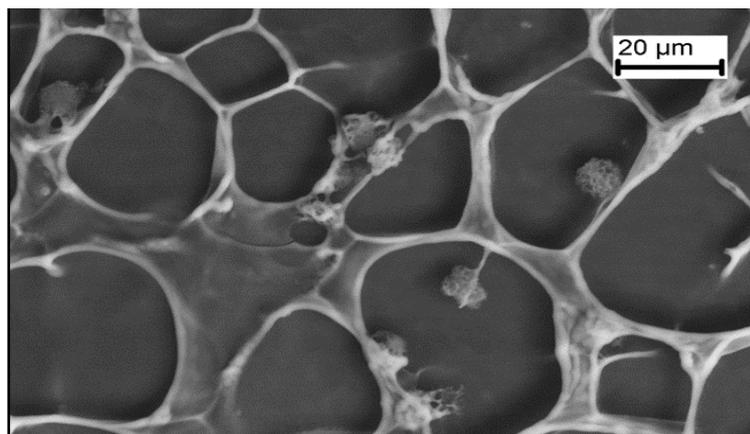


Рисунок 17 – СЭМ изображение участка поверхности пластикового носителя, заселенного эталонной культурой *Aspergillus*

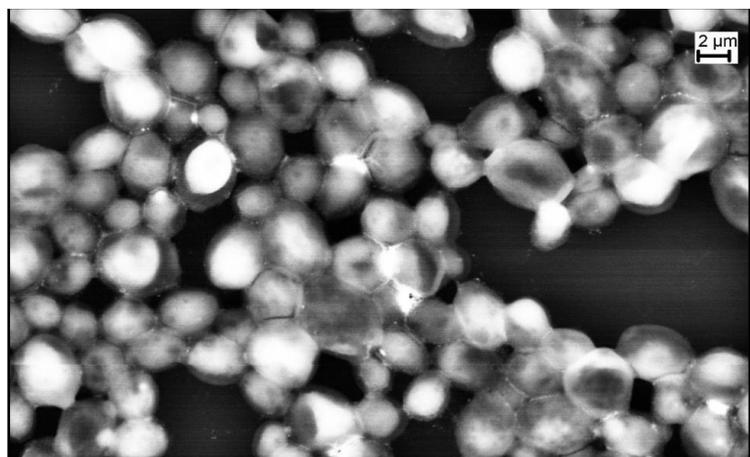


Рисунок 18 – СЭМ изображение участка поверхности пластикового носителя, заселенного эталонной культурой *Candida*

3.1.2. Простейшие

Из всех простейших наибольший интерес для офтальмологии на данный момент представляет род *Acanthamoeba*. Акантамеба имеет две стадии в жизненном цикле: вегетативную, устойчивую к внешним воздействиям – цисту (диаметр от 7 до 25 мкм) и взрослую активную особь – трофозоит (размер 10–45 мкм). Трофозоит (Рисунок 19а) — овальной, треугольной или неправильной формы с выростами псевдоподиями. Трофозоит часто похож на фибробласты или фагоциты в нативных образцах. От фибробластов он отличается «мутной» яркой окраской цитоплазмы с большим количеством вакуолей, маленьким ядром и иногда заметной пищеварительной вакуолью. Трофозоит мелких амёб практически неотличим от фагоцита. Цисты уверенно диагностируются по форме, паттерну с яркими «прожилками», полигональным мотивам в строении стенок (типа футбольного мяча) и наличием открытых после выхода клеток цист (Рисунок 19б), которые почти всегда можно обнаружить в обильной пробе.

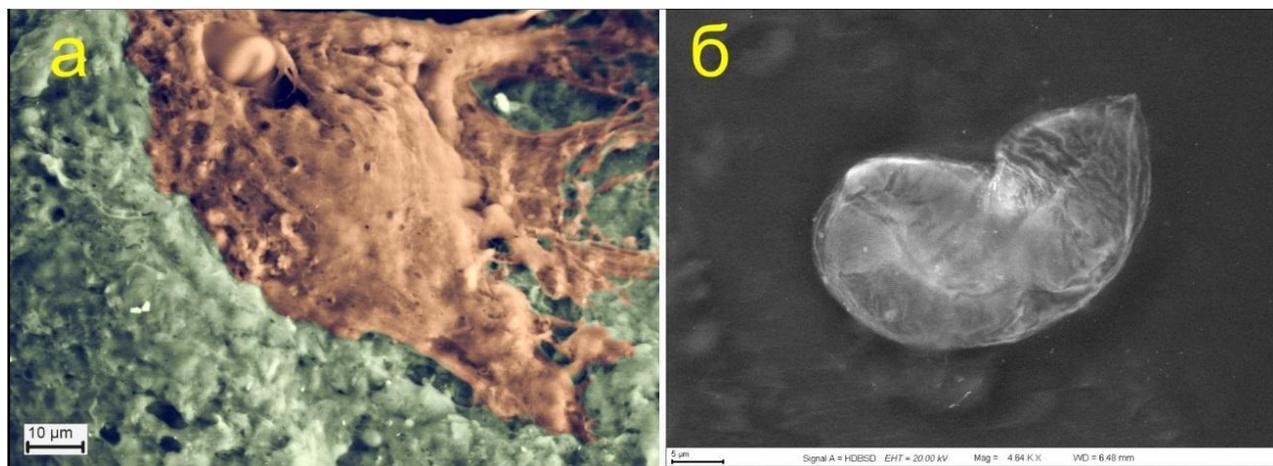


Рисунок 19 а,б – Снимок амёбы, визуализированной методом СЭМ с лантаноидным контрастированием

3.2. Температурный оптимум роста микроорганизмов, выделенных с глазной поверхности

По результатам оригинального микробиологического метода у 14 из 15 исследуемых на ГП были обнаружены микроорганизмы (Таблица 8). При этом колонии большинства микроорганизмов успешно росли при температуре +24°C. Такое свойство микроорганизмов свидетельствует о психротолерантности – то есть способности адаптироваться к относительно низким температурам. Это свойство у исследуемых микроорганизмов проявлялось как облигатно, в том случае, если колонии выделялись исключительно при +24 °С (у 3-х пациентов из подгруппы 1б), так и факультативно, в тех случаях, когда рост колоний происходил и при +24 °С и при +37 °С (7 пациентов из подгруппы 1б и 3-е исследуемых из подгруппы 1а). При этом были зафиксированы два варианта факультативной психротолерантности: в первом варианте (у 4-х пациентов подгруппы 1б) наблюдался ранний синхронный рост микроорганизмов в обоих температурных режимах, то есть признаки психротолерантности были явно выраженными; во втором варианте (у 3-х исследуемых из подгруппы 1а и 3-х пациентов подгруппы 1б) рост микроорганизмов при +24 °С был более поздним, то есть признаки психротолерантности были выражены слабо.

Таблица 8 – Результаты термографического исследования и наблюдаемый температурный оптимум роста колоний микроорганизмов с ГП

Группа	Участники	Температура, °С			Микроорганизмы		
		исследуемый глаз	контралатеральный глаз	Δ	рост колоний при 37, ранний	рост колоний при 24, ранний	рост колоний при 24, поздний
3а	1	33.7	33.6	+0,1	<i>Staphylococcus capitis</i>	-	-

Продолжение Таблицы 8

3а	2	33.2	33.3	-0,1	-	-	-
	3	33.4	33.6	-0,2	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Micrococcus luteus</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Micrococcus luteus</i>
	4	34.2	34.4	-0,2	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Streptococcus viridans</i> group	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Streptococcus viridans</i> group
	5	33.6	33.5	+0,1	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Corynebacterium amycolatum</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Corynebacterium amycolatum</i>
3б	6	36.2	35.5	+0,7	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	-
	7	36.7	35.8	+0,9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
	8	33.3	34.2	-0,9	-	<i>Streptococcus viridans</i> group, <i>Acinetobacter lwoffii</i> ,	-
	9	36.5	35.7	+0,8	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	-
	10	35.8	35.2	+0,6	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
	11	33.8	34.6	-0,8	-	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Pseudomonas luteola</i> .	-
	12	33.1	34.3	-1,2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
	13	35.9	35.1	+0,8	<i>Streptococcus sanguinis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	<i>Streptococcus sanguinis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>
	14	36.1	35.4	+0,7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	15	36.2	35.3	+0,9	<i>Klebsiella oxytoca</i> .	<i>Klebsiella oxytoca</i> .	-

3.2.1. Возможные причины изменения оптимальной температуры культивирования микроорганизмов

В исследуемых группах был проведен совокупный анализ температурного оптимума роста ассоциированных с ГП колоний и данных термографии ГП.

Было выявлено, что в подгруппе 1а условной нормы, которая характеризовалась незначительным отклонением температуры исследуемого глаза от нормальной температуры и от температуры контралатерального глаза, признаки психротолерантности у выделенных с поверхности роговицы микроорганизмов либо отсутствовали, либо являлись слабо выраженными.

Микроорганизмы, выделенные с ГП подгруппы 1б с инфекционным кератитом с “холодным” пораженным глазом, проявляли признаки облигатной психротолерантности. Стоит отметить, что к облигатно психротолерантным можно отнести и микроорганизмы, выделенные у участника 12, если трактовать появление колоний *Staphylococcus epidermidis* как сомнительный результат, так как *Staphylococcus epidermidis* является распространенным контаминантом, вносимым в пробу с поверхности кожи. Учитывая этот факт, допустимо утверждение, что все микроорганизмы в подгруппе 1б с инфекционным кератитом с “холодным” пораженным глазом проявляли признаки облигатной психротолерантности.

У всех микроорганизмов, выделенных с ГП подгруппы 1б с инфекционным кератитом с “теплым” пораженным глазом, несмотря на повышение температуры пораженного глаза относительно нормы, наблюдались признаки холодовой устойчивости, а именно - факультативной психротолерантности. В этой подгруппе были выявлены как микроорганизмы со слабо выраженной факультативной психротолерантностью, так и явно выраженной. Микроорганизмы со слабо выраженной факультативной психротолерантностью были выделены у тех пациентов подгруппы с инфекционным кератитом с “теплым” пораженным глазом, у которых температура пораженного глаза не превышала норму более, чем на 2,5

°C (10, 13, 14). Интересно отметить, что с дальнейшим повышением температуры пораженного глаза усиливались признаки холодовой устойчивости колоний микроорганизмов. Так, микроорганизмы с явно выраженной факультативной психротолерантностью были выделены у тех пациентов подгруппы с инфекционным кератитом с “теплым” пораженным глазом, у которых температура пораженного глаза была выше нормальной более, чем на 2,5°C (6, 7, 9, 15).

Одним из основных результатов настоящего исследования можно считать обнаружение устойчивого сигнала облигатной психротолерантности при культивировании микроорганизмов, выделенных у пациентов с гипотермией ГП (в подгруппе 1б с инфекционным кератитом с “холодным” пораженным глазом). Стандартные бактериологические методы исследования не позволили бы обнаружить такие микроорганизмы.

Помимо установления факта облигатной психротолерантности микроорганизмов при гипотермии ГП, были выявлены признаки холодовой устойчивости микроорганизмов при инфекционных кератитах, не сопровождающихся понижением температуры пораженного глаза. Это можно объяснить тем, что и понижение температуры пораженного глаза, и ярко выраженное повышение его температуры в ответ на инфекционный процесс, можно объединить в единую группу случаев, при которой наблюдается явная температурная дисрегуляция ГП (Рисунок 20). Такое состояние объединило 7 пациентов из подгруппы 1б (6-9, 11, 12, 15) И именно в этих случаях температурный оптимум роста микроорганизмов смещается в сторону холодовой устойчивости.

При ретроспективном анализе амбулаторных карт пациентов с инфекционным кератитом было выявлено то, что у пяти из семи пациентов, объединенных в группу с выявленным состоянием тепловой дисрегуляции ГП, были признаки, потенциально указывающие на нейротрофические нарушения (Таблица 9). Так, у пациента 7 был лагофталм, у пациента 12 - состояние после удаления лицевого нерва, у пациентов 8, 11, 15 были признаки нейротрофической кератопатии, характеризующиеся выявленным снижением чувствительности

роговицы, что отмечалось при первичном осмотре (При этом в случаях инфекционного кератита с незначительным повышением температуры пораженного глаза, таких признаков выявлено не было).

Постоянный контакт ГП с окружающей средой, а также бессосудистый статус роговицы, занимающей значительную площадь ГП и естественным образом ограничивающий ее вовлеченность в иммунную систему, требуют лишь незначительного ухудшения иннервации и трофики для изменения температурных условий на ГП. И именно при таких условиях возможно появление жизнеспособных микроорганизмов со сниженным температурным оптимумом культивирования.

Стоит отметить, что микроорганизмы, которые были идентифицированы у пациентов с признаками тепловой дисрегуляции ГП (*Enterococcus faecalis*, *Streptococcus spp*, *Acinetobacter lwoffii*, *Bacillus licheniformis*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas luteola*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*) скорее всего не являются патогенами [21; 37; 45;102]. Хотя каждый из этих микроорганизмов был описан в публикациях, где им приписывали прямое участие в патологических состояниях, в том числе – глаза человека [20; 28; 35; 47; 65; 82; 90; 92; 101]. Вследствие этого возможно предположить, что отмеченная в публикациях колонизация тканей микроорганизмами, не характерными для патологических процессов, возможна при частичном "отключении" органа или участка тканей от генеральных систем организма-хозяина. В пользу этой гипотезы свидетельствует и то, что в части приведенных выше публикаций инфекционный процесс был отмечен при наличии иммуносупрессии.

Можно предположить, что при локальных нарушениях иннервации и трофики в большинстве случаев не может существовать резко разграниченных с точки зрения микробиологии статусов: полностью изолированная ткань, с комплексом психрофильных и психротолерантных микроорганизмов-сапрофитов, и ткань с сохранной связью с системами, обеспечивающих трофику и гомеостаз организма, с комплексом симбионтов и микробиологических патогенов. Чаще всего нарушения будет проявляться в дивергенции наблюдаемых температур

культивирования: помимо "нормального" роста при температуре +37 °С, будет возникать аномально быстрый рост при +24 °С — сигнал эволюционно обусловленной психротолерантности микробиоты. При этом предпочтительный рост при пониженной температуре будут демонстрировать как известные патогены, так и микроорганизмы, обыкновенно к ним не относимые.

Таблица 9 – Характеристика исследуемых групп

Группа	Участники	Возраст	Состояние слизистой и сопутствующие факторы
3а	1	27	OU: Норма. Миопия слабой степени.
	2	27	OU: Норма.
	3	45	OU: Норма. Пресбиопия.
	4	44	OU: Норма. Пресбиопия.
	5	82	OU: Миопия высокой степени. Начальная катаракта
3б	6	76	OD: Инфекционный кератоконъюнктивит. Артифакция.
	7	44	OD: Лагофтальм. Вторичная инфекционная язва роговицы. НК. Состояние после тарзорафии.
	8	82	OS: Герпесвирусный кератит с присоединением вторичной инфекции, артифакция. НК.
	9	37	OS: Инфекционный кератит.
	10	34	OS: Периферический краевой кератит.
	11	53	OS: Герпесвирусный кератит с присоединением вторичной инфекции. НК.
	12	47	OD: Инфекционная язва роговицы. НК. Парез лицевого нерва слева. Состояние после удаление менингиомы.
	13	41	OD: Инфекционный кератит.
	14	40	OD: Инфекционный кератит. Миопия средней степени.
	15	70	OD: Состояние после СКП. Инфекционный кератит. Глаукома о/у Па. НК.

OD – правый глаз, OS – левый глаз, OU – правый и левый глаз, СКП – сквозная кератопластика, о/у – открытоугольная, НК – нейротрофическая кератопатия

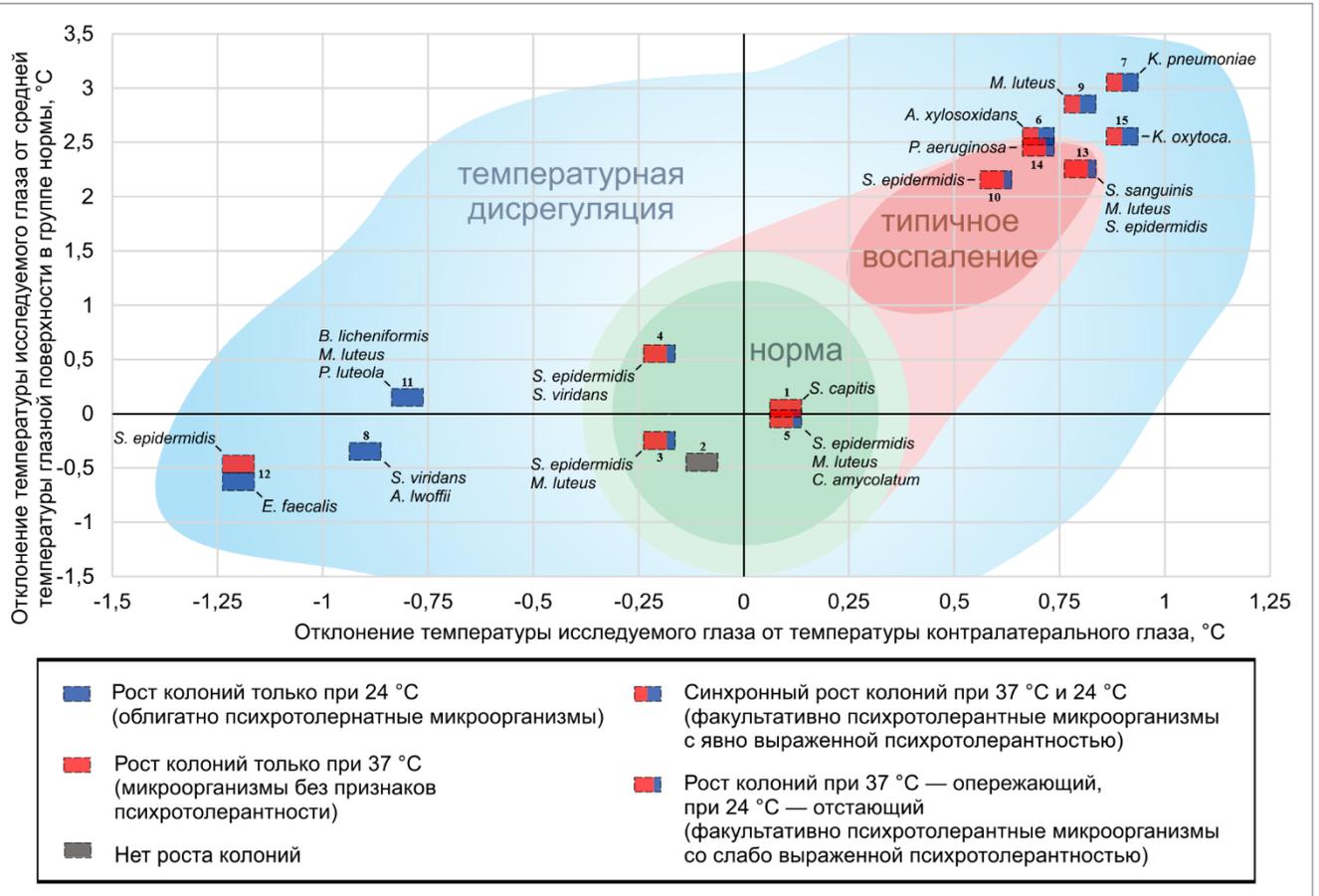


Рисунок 20 – Распределение температурных оптимумов роста колоний микроорганизмов относительно температуры глазной поверхности

3.3. Сравнение данных результатов культурального метода и сканирующей электронной микроскопии с лантаноидным контрастированием условно здоровой и инфицированной глазной поверхности

Для оценки предложенного метода СЭМ+ЛК проведено сравнение результатов фенотипической идентификации микроорганизмов с результатами культурального исследования.

3.3.1. Результаты культурального исследования и сканирующей электронной микроскопии с лантаноидным контрастированием микробиоты «здоровой» глазной поверхности

В подгруппе 2а культуральным методом в 8 образцах были выделены грамположительные коккоморфные микроорганизмы, среди которых были идентифицированы: *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus viridans group*. В 3 образцах было выделено одновременно несколько микроорганизмов в следующем сочетании:

- 1.) *Micrococcus luteus*, *Corynebacterium amycolatum*, *Staphylococcus epidermidis*;
- 2.) *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans group*;
- 3.) *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*.

Роста микроорганизмов не наблюдалось в 4 случаях.

Методом СЭМ+ЛК в 10 образцах визуализировались коккоморфные микроорганизмы, в 3 образцах – коккоморфные в сочетании с палочковидными микроорганизмами. Не удалось определить объекты, которые можно было интерпретировать в качестве микробиального окружения, в двух образцах.

3.3.2. Сопоставление результатов исследования микробиоты условно здоровой глазной поверхности, полученных культуральным методом и сканирующей электронной микроскопии с лантаноидным контрастированием

При сравнении образцов подгруппы 2а, подготовленных разными методами, были получены следующие результаты: соответствие фенотипических признаков и данных молекулярной идентификации наблюдалось в 11 из 15 образцов (культуральным методом в 10 случаях были выделены грамположительные кокки, в одном случае в сочетании с *Corynebacterium amycolatum*), частичное соответствие (как минимум один из обнаруженных микроорганизмов соответствовал данным визуализации) – в 2 из 15 образцов, несоответствие – в 2 из 15 образцов. При этом в случаях частичного соответствия методом СЭМ+ЛК определялось большее количество фенотипически отличающихся микроорганизмов, чем было выделено культуральным методом исследования, а именно помимо коккоморфных микроорганизмов определялись палочковидные микроорганизмы. В двух случаях несоответствия посев был отрицательным, а методом СЭМ+ЛК визуализировались коккоморфные микроорганизмы.

3.3.3. Сопоставление результатов исследования микробиоты «здоровой» глазной поверхности методом сканирующей электронной микроскопии с лантаноидным контрастированием с известными представлениями о микробиологическом разнообразии

Было проведено сопоставление результатов фенотипической идентификации микроорганизмов условно здоровой ГП посредством СЭМ с лантаноидным контрастированием и данных научных работ по исследованию микробиоты

здоровой ГП культуральным и молекулярно-генетическими методами исследования (Таблица 10).

Таблица 10 – Соответствие фенотипической идентификации микроорганизмов с условно нормальной глазной поверхностью согласно рубрикатору и результатов других методов исследования микробиоты глазной поверхности в норме

Фенотипические характеристики микроорганизмов по данным метода СЭМ	Соответствующий (вероятный) род микроорганизмов по данным культуральнозависимых и молекулярно-генетических методов		
	КМ	МГМ	
		МТС	ПЦР
С	Staphylococcus, Micrococcus, Rothia, Kocuria	Staphylococcus, Micrococcus, Kocuria, Aaerococcus, Parvimonas	Staphylococcus, Veillonella, Micrococcus
Dc	Streptococcus, Enterococcus	Streptococcus, Neisseria	-
B	Corynebacterium, Propionibacterium, Rhizobium, Gordonia, Proteus, Escherichia, Morganella, Moraxella, Serratia, Citrobacter, Brevundimonas	Corynebacterium, Propionibacterium, Faecalibacterium, Lactobacillus, Brevibacterium, Cutibacterium, Pseudomonas, Sphingomonas, Enhydrobacter, Brevundimonas, Methylobacterium, Chryseobacterium, Prevotella, Fusobacterium	Propionibacterium, Moraxella
Sfb	Bacillus, Paenibacillus	Bacillus, Paenibacillus, Clostridium	-
Pb	Microbacterium	Microbacterium	-
Lb	-	Actinomyces, Streptomyces	-
Cb	-	Paracoccus, Acinetobacter, Haemophilus	-

КМ – культуральный метод исследования; МГМ – молекулярно-генетические методы исследования; МТС – метагеномное секвенирование; ПЦР – полимеразная цепная реакция

Резюме: методом СЭМ с лантаноидным контрастированием было выявлено довольно высокое фенотипическое разнообразие микроорганизмов, колонизирующих условно здоровую ГП. Морфологические параметры микроорганизмов, характерных для условно здоровой ГП, по данным СЭМ оказались более разнообразными по сравнению с культуральным методом и ПЦР. Таким образом, часть бактерий, составляющих микробиоту условно здоровой ГП, осталась не учтенной традиционным культуральным методом и методом ПЦР.

3.3.4. Результаты идентификации инфекционного агента при воспалительных заболеваниях глазной поверхности культуральным методом

В большинстве случаев культуральным методом из образцов подгруппы 2б были выделены исключительно грамположительные кокки – в 12 из 30 проб, при этом в 10 случаях было выделено несколько видов грамположительных коккоморфных микроорганизмов. Среди коккоморфных микроорганизмов были идентифицированы следующие виды: *Streptococcus vestibularis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus viridans group*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*.

В 5 случаях были выделены исключительно грамотрицательные палочки: *Achromobacter xylosoxidans*, *Moraxella osloensis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*.

В трех случаях были идентифицированы грибы: *Candida albicans*

У трех участников исследования были идентифицированы несколько видов микроорганизмов, которые отличались по морфологическим признакам, окраске по Граму и типовой принадлежности.

В первом случае у пациента, перенесшего лазерный кератомилез (ЛАСИК) были идентифицированы следующие виды бактерий: *Mycobacterium abscessus*, *Micrococcus luteus*. Примечательно, что по последним данным в научных

публикациях появляется все больше сообщений о клинических случаях осложнений, проявляющихся кератитом, после кераторефракционных операций. Наиболее частыми инфекционными агентами при этом являются нетуберкулезные микобактерии, к которым в том числе относится *Mycobacterium abscessus*, и коагулазонегативные стафилококки.

Во втором случае были выделены *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Shpingomonas paucimobilis*. В третьем – *Acinetobacter lwoffii*, *Streptococcus viridans group*.

Смешанная флора была выделена у двух участников исследования, а именно одновременно бактерии и грибы следующих видов: *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Роста микроорганизмов не наблюдалось – у 5 участников исследования.

3.3.5. Сопоставление результатов идентификации инфекционного агента при воспалительных заболеваниях глазной поверхности методом сканирующей электронной микроскопии и культуральным методом

При сравнении образцов подгруппы 2б, проанализированных двумя методами, были получены следующие результаты: соответствие фенотипических признаков и данных молекулярной идентификации наблюдалось в 24 из 30 образцов, частичное соответствие (как минимум один из обнаруженных микроорганизмов соответствовал) – в 2 из 30 образцов, несоответствие – в 4 из 30 образцов.

Методом СЭМ с лантаноидным контрастированием в 4 случаях были визуализированы палочковидные микроорганизмы с умеренным удлинением без полярных депозитов, в 1 случаев по фенотипическим признакам определялись коккобациллы (по данным культурального метода была выделена *Klebsiella oxytoca*), во втором случае была визуализирована биопленка с палочковидными

микроорганизмами с умеренным удлинением без полярных депозитов (культуральным методом была выделена *Moraxella osloensis*), в третьем случае визуализировались палочковидные микроорганизмы по фенотипическим признакам которых были сходны с *Pseudomonas aeruginosa* (культуральным методом была выделена *Pseudomonas aeruginosa*) и в четвертом случае также наблюдалось соответствие фенотипических признаков микроорганизмов и данных молекулярной идентификации (была выделена *Klebsiella pneumoniae*)

В 9 случаях методом СЭМ с лантаноидным контрастированием визуализировались клетки дрожжеподобных грибов, причем в 6 случаях — в качестве единственного микроорганизма, в 3 случаях — в сочетании с коккоморфными и палочковидными микроорганизмами. При этом культуральным методом соответствие наблюдалось в 5 из 9 случаев: в трех случаях — *Candida albicans*, в одном случае — *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Shpingomonas paucimobilis*, *Candida albicans*, еще в одном случае — *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*. Несоответствие наблюдалось в четырех случаях: в трех случаях рост микроорганизмов отсутствовал (методом СЭМ с лантаноидным контрастированием в одном случае визуализировались клетки дрожжеподобных грибов, палочковидные и коккоморфные микроорганизмы; во двух случаях только клетки дрожжеподобных грибов), в одном случае была выделена *Achromobacter xylosoxidans* (методом СЭМ+ЛК визуализировались клетки дрожжеподобных грибов).

В 2-х случаях частичного соответствия результатов исследования методом СЭМ с лантаноидным контрастированием визуализировались коккоморфные и палочковидные микроорганизмы, а культуральным методом были идентифицированы только грамположительные кокки: у первого участника исследования визуализировались менее метаболически активные коккоморфные микроорганизмы и более метаболически активные палочковидные бактерии с четкими контурами внешних оболочек, культуральным методом были выделены *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus sanguinis*, *Micrococcus luteus*; у второго участника визуализировались коккоморфные микроорганизмы, диплококки и

единичные палочковидные микроорганизмы с умеренным удлинением, без образования спор и полярных депозитов, культуральным методом были выделены *Streptococcus vestibularis*, *Streptococcus sanguinis*

3.4. Верификация микробиологического разнообразия «здоровой» и инфицированной глазной поверхности

Для верификации микроорганизмов, входящих в состав микробиоты условно-здоровой ГП и способных вызывать МК, нами был использован предложенный метод СЭМ с лантаноидным контрастированием.

3.4.1. Результаты исследования микробного профиля «здоровой» глазной поверхности методом сканирующей электронной микроскопии с лантаноидным контрастированием

В первую очередь оценивали частоту обнаружения микроорганизмов в пробе. По результатам визуализации импрессионных проб участников подгруппы 3а в большинстве проб (43 из 50) помимо слущенных клеток эпителия были обнаружены коккоморфные, палочковидные или грибоподобные микроорганизмы в различных комбинациях. Исключительно клетки бактерий были визуализированы в 37 случаях, клетки грибов в 6 пробах, причем в 5 пробах помимо грибоподобных клеток были также обнаружены бактериальные клетки (Рисунок 21). В семнадцати пробах были визуализированы исключительно коккоморфные микроорганизмы, в одиннадцати — исключительно палочковидные, в одной — исключительно грибоподобные. В девяти пробах были обнаружены коккоморфные и палочковидные микроорганизмы, в двух — коккоморфные и грибоподобные, в трех — палочковидные и грибоподобные. В семи пробах из пятидесяти не удалось

визуализировать объекты, которые можно было бы идентифицировать как микроорганизмы. Таким образом, коккоморфные микроорганизмы обнаруживались на ГП с большей частотой в качестве одного визуализированного микроорганизма.

Во всех пробах визуализировали слущенные клетки роговичного эпителия на поверхности адгезивного носителя. В единичном случае были обнаружены в небольшом количестве клетки полиморфноядерных лейкоцитов с характерной формой ядра. Нередко микроорганизмы располагались на поверхности клеток роговичного эпителия. В основном со структурами цитоплазматической мембраны эпителия механически связаны были как мелкие палочковидные, так и коккоморфные микроорганизмы. Крупных палочковидных микроорганизмов на поверхности эпителиальных клеток не было обнаружено. Помимо клеток эпителия и микробного окружения в высоком разрешении визуализировались элементы ультраструктуры эпителиальных клеток, в частности клеточное ядро и ядрышко.

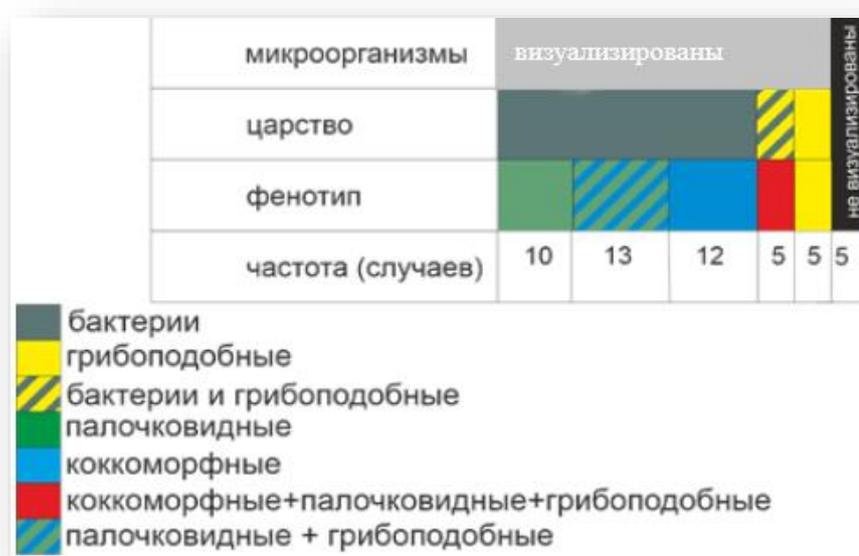


Рисунок 21 – Диаграмма распределения микроорганизмов, визуализированных методом СЭМ в образцах «здоровой» глазной поверхности

В 28 из 43 проб, в которых был обнаружен микробный компонент, визуализировались коккоморфные микроорганизмы диаметром от 0,9 до 1,5 мкм. Коккоморфные микроорганизмы в основном были представлены в виде групп и индивидов, связанных с поверхностью эпителиальных клеток роговицы (Рисунок 22). Также встречались коккоморфные микроорганизмы, расположенные отдельно от клеток эпителия.

Клетки коккоморфных микроорганизмов обнаруживали одиночно, попарно и в некоторых случаях в виде скоплений. Примечательно, что парное расположение и расположение в виде тетрад может быть характерно для представителей рода *Micrococcus*, которые обнаруживались на условно здоровой ГП как с помощью культурального метода, так и при использовании метагеномного секвенирования. Расположение в виде скоплений более характерно для рода *Staphylococcus*.

В 9 образцах коккоморфные микроорганизмы визуализировали в сочетании с палочковидными микроорганизмами, в 2 образцах — в сочетании с клетками дрожжеподобных грибов.

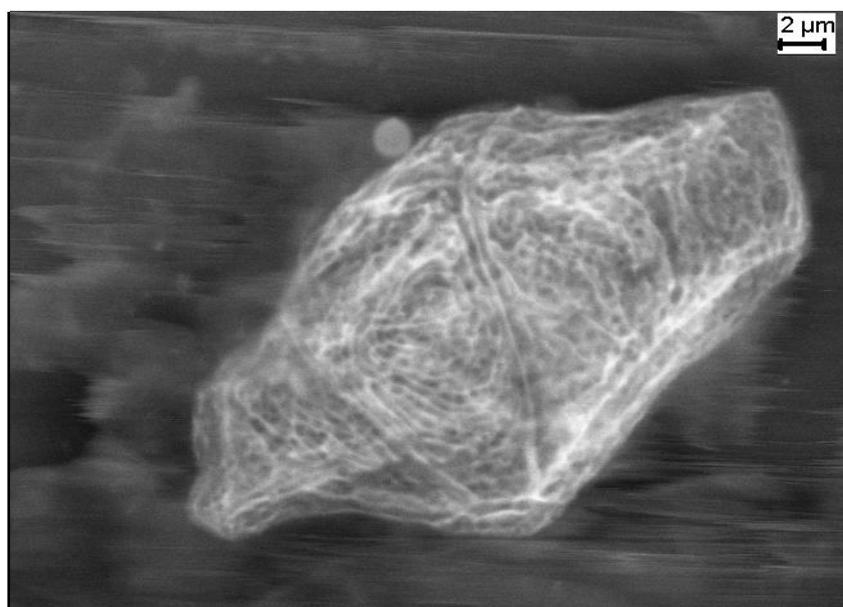


Рисунок 22 – Снимок эпителиальной клетки с кокком на ее поверхности, визуализированные с помощью сканирующей электронной микроскопии

В 23 из 43 проб визуализировали палочковидные микроорганизмы длиной от 1,2 мкм до 4,0 мкм, шириной от 0,4 до 1,2 мкм. В 9 пробах среди палочковидных микроорганизмов были визуализированы палочки с яркими локусами, расположенными биполярно (Рисунок 23). По данным настоящего исследования такие микроорганизмы могут относиться к роду *Corynebacterium*.

В 3 пробах обнаружили одиночные палочковидные бактерии длиной 2—3 мкм и шириной до 1 мкм. Их характерной особенностью явились четкие контуры бактериальной клетки и слабо изогнутая бобовидная форма (Рисунок 24). Данные палочковидные микроорганизмы по визуальным признакам можно было отнести к роду *Pseudomonas*, который, по данным научной литературы, определялся на условно здоровой ГП методом метагеномного секвенирования, но не культуральным методом.

Крупные палочковидные микроорганизмы с шириной, превышающей 0,7 мкм, визуализировали в 6 пробах. Причем часть из них имела «булавовидную форму» с одним концом закругленным, а с другим — суженным. Такие морфометрические данные наиболее характерны для представителей рода *Propionibacterium*, которые характерны для здоровой ГП как по данным культуральнозависимых методов исследования, так и молекулярно-генетических.

Спорообразующие палочковидные клетки, располагающиеся цепочкой, визуализировали в 3 образцах. По характерным визуальным признакам эти палочковидные спорообразующие микроорганизмы можно отнести к роду *Bacillus* (Рисунок 25), которые характерны для нормальной ГП и идентифицируются культуральным методом и метагеномным секвенированием.

В 2 пробах были обнаружены палочковидные микроорганизмы с длиной, превышающей 4 мкм и шириной 0,4–0,5 мкм (Рисунок 26). Тонкие, крупные палочковидные бактерии могут принадлежать к роду *Mycobacterium*.

В 3 пробах палочковидные микроорганизмы визуализировали в сочетании с грибоподобными клетками.

В 6 пробах визуализировали грибоподобные клетки, которые морфологически сходны с дрожжеподобными грибами (Рисунок 27),

представляющими собой сферические или овоидные клетки размером 3—5 мкм, который превышает диаметр коккоморфных бактерий. Следует отметить, что такие объекты можно перепутать с другими относительно крупными объектами, такими как компактизированное ядро десквамированного эпителия, диаметр которого может совпадать с диаметром грибковой клетки.

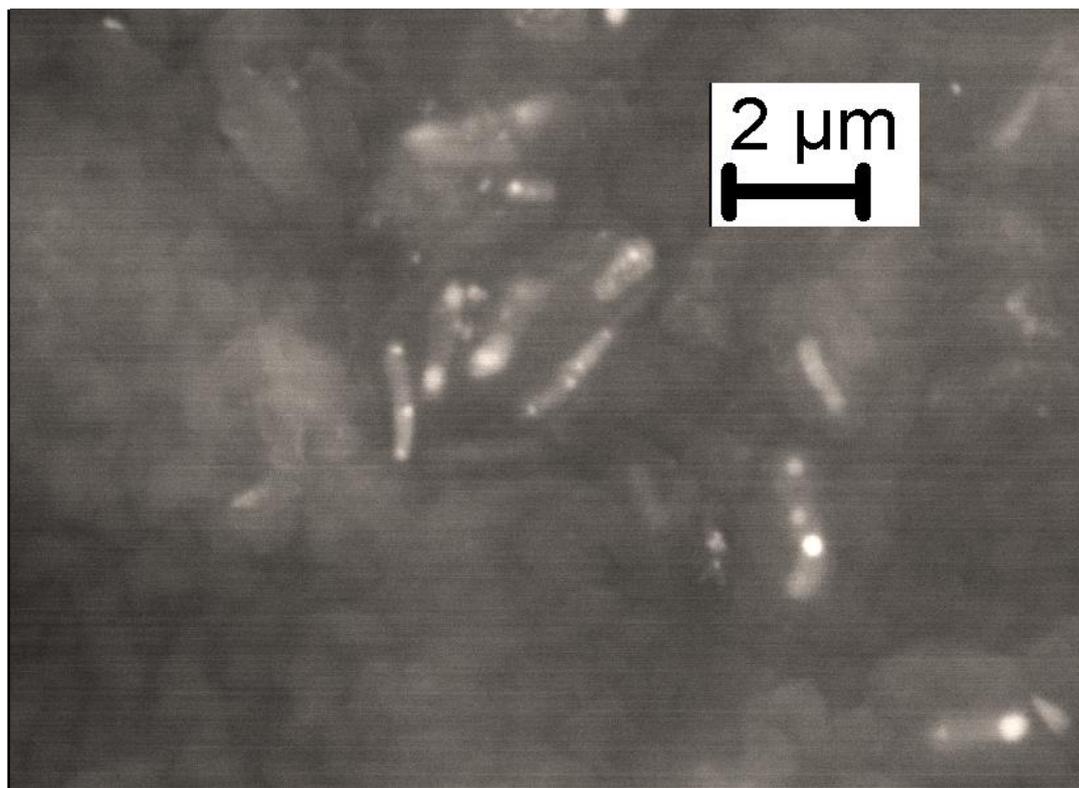


Рисунок 23 – СЭМ-изображение *Corynebacterium* в импрессионной пробе с условно здоровой ГП

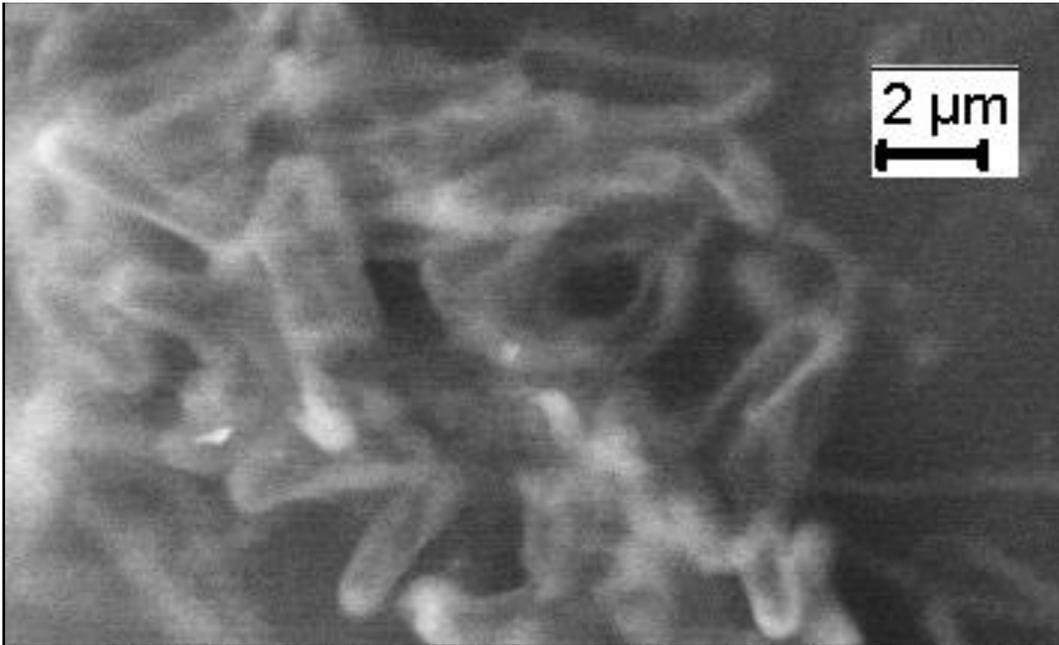


Рисунок 24 – СЭМ-изображение *Pseudomonas* в импрессионной пробе с условно здоровой ГП



Рисунок 25 – СЭМ-изображение *Bacillus* в импрессионной пробе с условно здоровой ГП



Рисунок 26 – СЭМ-изображение *Mycobacterium* в импрессионной пробе с условно здоровой ГП



Рисунок 27 – СЭМ-изображение дрожжеподобных грибов в импрессионной пробе с условно здоровой ГП

3.4.2. Результаты визуализации инфекционного агента при воспалительных заболеваниях глазной поверхности методом сканирующей электронной микроскопии с лантаноидным контрастированием

По результатам визуализации образцов подгруппы 2б в большинстве проб (45 из 50) помимо слущенных клеток эпителия были обнаружены коккоморфные, палочковидные или грибоподобные микроорганизмы в различных сочетаниях. В 35 импрессионных пробах были обнаружены исключительно клетки бактерий, в 5 — только грибоподобные клетки, в 5 образцах визуализировали бактериальные и грибоподобные клетки (Рисунок 28). В двенадцати пробах были визуализированы исключительно коккоморфные микроорганизмы, в десяти — исключительно палочковидные. В тринадцати пробах были обнаружены коккоморфные и палочковидные, в пяти — коккоморфные, палочковидные и грибоподобные. В пяти пробах из 50 не визуализировали объекты, которые можно было бы идентифицировать в качестве микробного окружения, однако визуализировали клетки полиморфноядерных лейкоцитов, эритроцитов и клетки роговичного эпителия.

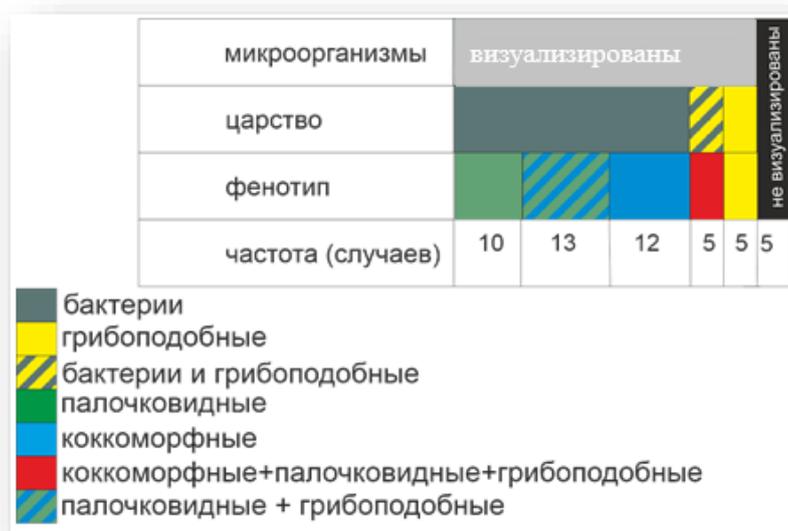


Рисунок 28 – Диаграмма распределения микроорганизмов, визуализированных методом СЭМ в образцах с глазной поверхности при кератите

По результатам визуализации методом СЭМ+ЛК во всех пробах визуализировали слущенные клетки роговичного эпителия на поверхности адгезивного носителя. Во многих образцах были обнаружены клетки полиморфноядерных лейкоцитов с характерной формой ядра, форменные элементы крови (в частности эритроциты с характерной двояковогнутой формой). Нередко микроорганизмы располагались на поверхности клеток роговичного эпителия. Клетки роговичного эпителия часто были вакуолизированы, без микроворсинок и находились в состоянии апоптоза. Также среди клеток эпителия обнаруживали большое количество слизистого компонента. Часть бактерий образовывали биопленку, что затрудняло их непосредственную визуализацию. Однако, способность к биопленкообразованию представляет собой защитный механизм, который участвует в подавлении фагоцитоза и формировании антибиотикорезистентности бактерий. Визуализация такого защитного механизма бактерий – ценная информация для врачей клиницистов.

В 30 из 45 проб, в которых был обнаружен микробный компонент, визуализировали коккоморфные микроорганизмы диаметром от 0,8 до 1,6 мкм. Коккоморфные бактерии располагались в виде скоплений, часть из них располагалась на поверхности клеток роговичного эпителия.

При контрастировании лантаноидами можно оценить метаболическую активность микроорганизмов, так на снимках визуализируют коккоморфные микроорганизмы с яркими межклеточными контактами, что свидетельствует об активном взаимодействии между клетками. Также визуализировали кокки, которые были менее ярко окрашены. Часть клеток бактерий находилась в состоянии деления.

В 13 образцах коккоморфные микроорганизмы визуализировали в сочетании с палочковидными микроорганизмами, в 5 образцах в сочетании с клетками палочковидных микроорганизмов и дрожжеподобных грибов.

В 28 из 45 проб визуализировали палочковидные микроорганизмы длиной от 1,2 мкм до 7,5 мкм, шириной от 0,5 до 1,2 мкм. В 11 пробах среди палочковидных микроорганизмов нами были визуализированы палочки с четкими контурами

клеточных стенок, которые располагались в виде скоплений (рисунок 29, 30), часть из них была расположена на поверхности клеточной стенки роговичного эпителия. По визуальным данным такие микроорганизмы могут относиться к *Pseudomonas* и *Moraxella*. При этом последние научные исследования показали, что род *Pseudomonas* наиболее частый патогенный микроорганизм среди грамотрицательных бактерий, вызывающий МК. Также в части проб визуализировали биопленки, что характерно для этих микроорганизмов.

В 11 пробах были обнаружены одиночные палочковидные бактерии длиной 1,5—2,8 мкм и шириной до 1,2 мкм. Их характерной особенностью являлось образование капсулы, которую визуализировали на снимках в виде двойного контура (Рисунок 31). Также для них был характерен полиморфизм, поскольку они были представлены как коккобациллами, так и палочками с умеренным удлинением. Данные палочковидные микроорганизмы по визуальным признакам можно отнести к роду *Klebsiella*, которые способны вызывать МК.

Среди палочковидных микроорганизмов в 5 образцах визуализировали короткие палочки длиной – 1,5–2,0 мкм и шириной – 1,0–1,5 мкм, которые можно было отнести к коккобациллам. Такие морфометрические данные наиболее характерны для представителей рода *Acinetobacter*, которые выделяют с ГП при инфекционных кератитах. Некоторые клетки бактерий находились в процессе деления, что визуально проявлялось в виде биполярного окрашивания делящихся клеток.

Спорообразующие палочковидные микроорганизмы длиной – 3,0–5,0 мкм и шириной – 1,0–1,2 мкм визуализировали в 3 пробах. Для данных палочковидных микроорганизмов было характерно расположение клеток в виде цепочек или штакетообразных скоплений. Основываясь на морфологических характеристиках, они были отнесены к роду *Bacillus*. По данным мировой статистики, род *Bacillus* способен вызывать МК.

В 3 пробах были обнаружены палочковидные микроорганизмы с длиной, превышающей 4 мкм, и шириной – 0,4–0,5 мкм (Рисунок 32). Тонкие, крупные палочковидные бактерии могут принадлежать к роду *Mycobacterium*. В научной

литературе известны случаи МК, вызванного нетуберкулезными микобактериями у пациентов после лазерных вмешательств на роговице.

В 6 пробах были визуализированы палочковидные микроорганизмы длиной – 1,1–2,0 мкм и шириной – 0,4–0,8 мкм. Клетки бактерий неоднородно захватывали контрастирующий элемент неодим, в центре они были менее яркие, чем на периферии клетки (Рисунок 33). По морфологическим характеристикам такие микроорганизмы можно отнести к роду *Achromobacter*. В 2-х случаях на снимках СЭМ визуализировали биопленку, покрывающую бактерии, которая выглядела контрастнее самих микроорганизмов. По данным научной литературы, представители этого рода были идентифицированы при МК.

В 5 пробах палочковидные микроорганизмы визуализировали в сочетании с клетками коккоморфных бактерий и с грибоподобными клетками.



Рисунок 29 – СЭМ изображение участка поверхности пластикового носителя импрессионной пробы ГП. Визуализируется группа клеток, сходных с эталонной культурой *Pseudomonas*

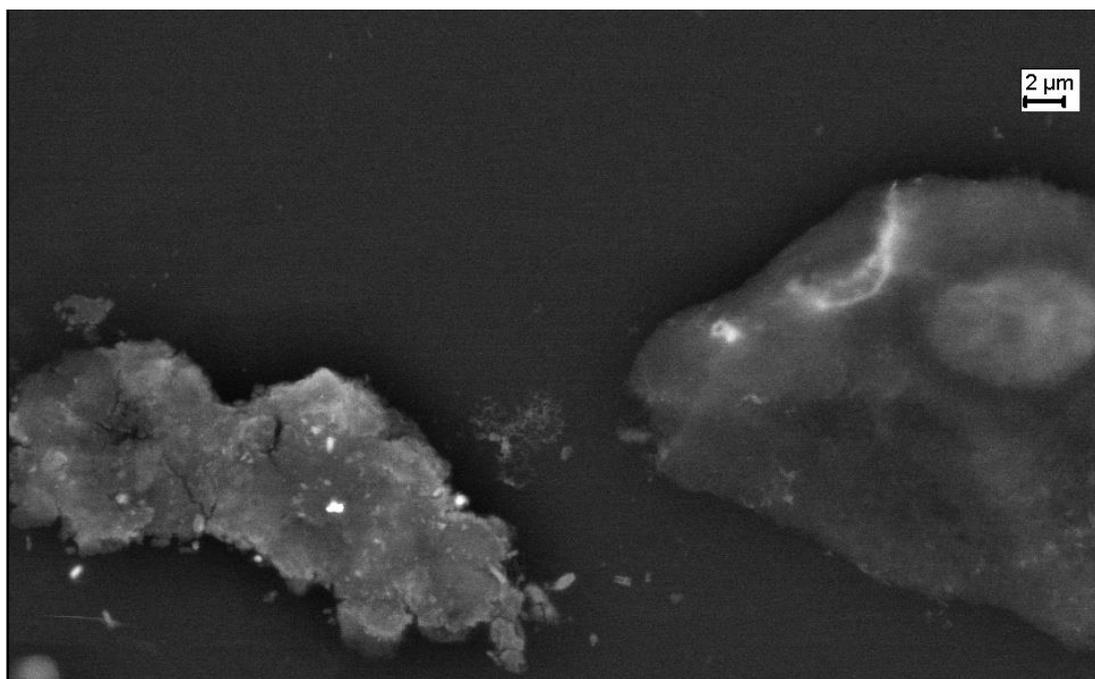


Рисунок 30 – СЭМ изображение участка поверхности пластикового носителя импрессионной пробы ГП. Визуализируется группа клеток, сходных с эталонной культурой *Moraxella*

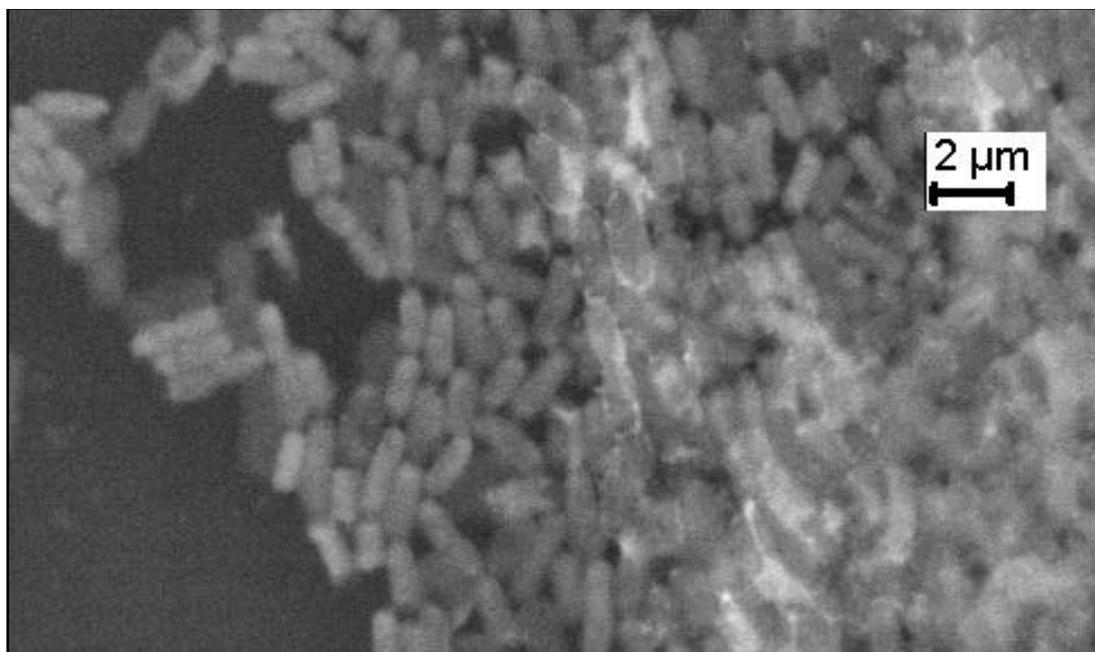


Рисунок 31 –СЭМ изображение участка поверхности пластикового носителя импрессионной пробы ГП. Визуализируется группа клеток, сходных с эталонной культурой *Klebsiella*

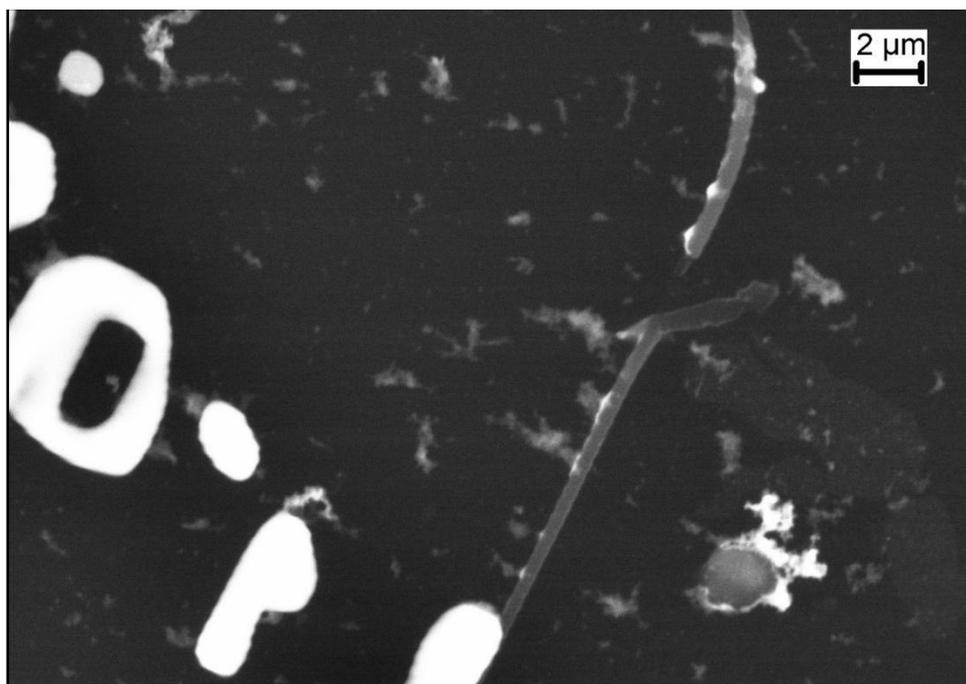


Рисунок 32 – СЭМ изображение участка поверхности пластикового носителя импрессионной пробы ГП. Визуализируется группа клеток, сходных с эталонной культурой *Mycobacterium*



Рисунок 33 – СЭМ изображение участка поверхности пластикового носителя импрессионной пробы ГП. Визуализируется группа клеток, сходных с эталонной культурой *Achromobacter*

В 10 пробах визуализировали грибоподобные клетки, которые морфологически сходны с дрожжеподобными грибами, представляющими собой сферические или овоидные клетки размером 3—5 мкм, который превышает диаметр коккоморфных бактерий. Причем в 5 случаях клетки дрожжеподобных грибов визуализировали с коккоморфными и палочковидными микроорганизмами.

3.5 Практические рекомендации по использованию фенотипической идентификации микроорганизмов для верификации данных диагностики при микробном кератите посредством применения сканирующей электронной микроскопии с лантаноидным контрастированием

На основании предыдущих исследований можно предложить следующую схему идентификации инфекционного агента:

Согласно клиническим рекомендация, на первом этапе диагностика проводится офтальмологом. При этом он оценивает клиническую картину (биомикроскопия, окраска флюоресцеином, тонометрия, максимальная корригированная острота зрения) данные анамнеза и динамику состояния пациента при ранее назначенном консервативном лечении. На основании собранных данных клиницист выдвигает предположительный этиологический патогенный возбудитель, исходя из чего назначает соответствующее лечение. После постановки первичного диагноза можно рекомендовать следующий алгоритм верификации данных диагностики (Рисунок 34).

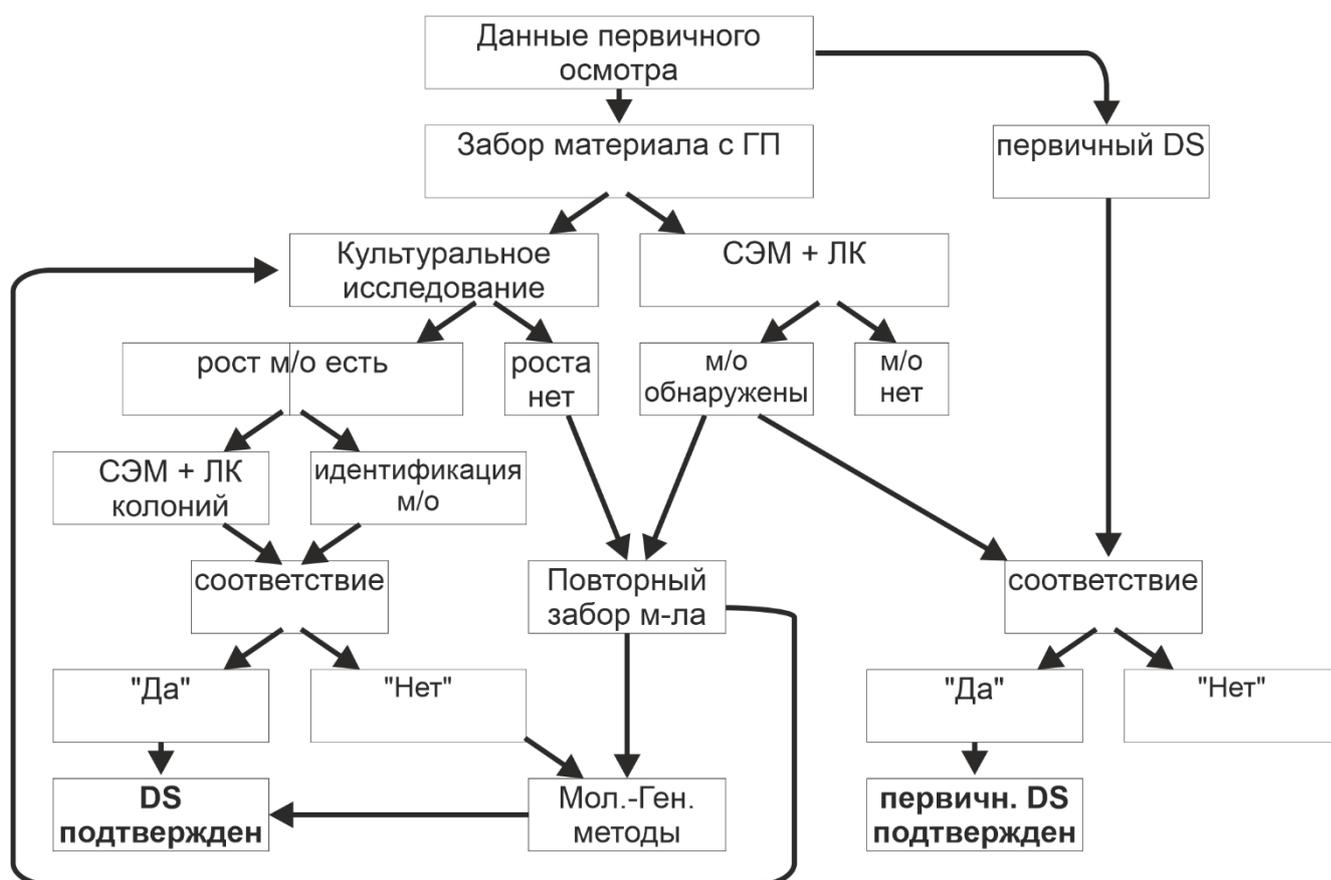


Рисунок 34 – Алгоритм фенотипической идентификации микроорганизмов для верификации данных диагностики при микробном кератите посредством применения СЭМ+ЛК

На втором этапе производится забор биологического материала с инфицированной ГП для проведения лабораторных методов исследования:

1. Импрессионная проба с ГП для СЭМ+ЛК (длительность проведения 40 минут)
2. Забор биологического материала с поверхности инфильтрата или края язвы роговицы для культурального исследования (длительность 3-5 дней)
3. Забор материала с поверхности инфильтрата или края язвы роговицы для молекулярно-генетического исследования (длительность 5 дней)

На третьем этапе клиницист получает результат исследования импрессионной пробы с ГП с помощью СЭМ+ЛК, идентификация визуализированного микроорганизма проводится с помощью атласа-определителя с изображениями колоний эталонных культур микроорганизмов, полученные методом СЭМ+ЛК.

После чего сравнивает данные о фенотипических признаках инфекционного возбудителя и диагноз, предполагаемый по клинической картине течения МК. При несоответствии данных офтальмолог корректирует назначенное лечение в соответствии с результатами визуализации.

На четвертом этапе при получении результатов культурального исследования проводится сравнение с данными СЭМ+ЛК импрессионной пробы с ГП. Анализ изображений, полученных на СЭМ, проводится с использованием атласа-определителя.

На пятом этапе при отрицательном результате культурального метода проводится молекулярно-генетическое исследование материала с ГП, либо при оснащённости клинической лаборатории данные исследования могут проводиться одновременно. После получения результата проводится сравнение перечня идентифицированных микроорганизмов с визуализированными и классифицированными посредством атласа-определителя в импрессионной пробе с ГП методом СЭМ+ЛК. Верификация молекулярно-генетических методов исследования позволяет исключить ложноположительные результаты, поскольку данный метод выявляет все микроорганизмы, находящиеся на ГП, вне зависимости от их метаболического статуса и жизнеспособности.

Также можно рекомендовать проведение внутреннего контроля методом СЭМ+ЛК с использованием атласа-определителя на всех этапах культурального исследования. При росте микроорганизмов на питательных средах дополнительно проводится исследования отпечатка колоний методом СЭМ+ЛК, что позволяет сравнить фенотипические характеристики выделенных микроорганизмов с визуализированными в импрессионной пробе с ГП. Двойной контроль позволяет более надёжно верифицировать результаты культурального исследования.

Использования метода СЭМ+ЛК в офтальмологической практике

Клинический пример 1

В клинику обратилась пациентка В. с двусторонним кератитом. До этого лечение проводилось в течение двух месяцев без положительного эффекта. В поликлинике по месту жительства был поставлен диагноз: герпетический стромальный кератит. Пациентке было проведено исследование импрессионной пробы с ГП по результатам которого визуализировались воспалительные клетки (Рисунок 35) полиморфноядерных лейкоцитов, микроорганизмы при этом не были выявлены. Также был проведен посев биоматериала, рост микроорганизмов при этом отсутствовал. На фоне проводимой консервативной терапии состояние не стабилизировалось, в связи с чем была проведена лечебная СКП. При бактериологическом исследовании иссеченного материала (роговичного диска) рост микроорганизмов отсутствовал. Однако после хирургического вмешательства на трансплантате появилась инфильтрация, а в передней камере гипопион (Рисунок 36). Повторно проводилось СЭМ+ЛК импрессионной пробы с роговицы и культуральное исследование биологического материала с ГП. На снимках СЭМ визуализировали клетки роговичного эпителия, воспалительные клетки, эритроциты и кокки (Рисунок 37). При культуральном исследовании наблюдался рост микроорганизмов на двух питательных средах (Рисунок 38) – хромогенный агар, кровяной агар. С целью верификации дополнительно было проведено исследование мазков с колоний методом СЭМ+ЛК, что позволило быстро определить морфологические характеристики выделенных микроорганизмов. На хромогенном агаре визуализировались клетки коккоморфных микроорганизмов (что соответствовало данным культурального исследования *Enterococcus spp.*), однако на кровяном агаре определялись клетки дрожжеподобных грибов и коккоморфные микроорганизмы (культуральное исследование выявило

Staphylococcus spp.). При этом роста микробов на селективных средах для грибов агар Сабуро и хромогенный агар для *Candid* не было. Также было выполнено ПЦР исследование (Рисунок 39) материала с роговицы, были идентифицированы следующие микроорганизмы: бактерии *Staphylococcus spp.*, дрожжеподобные грибы *Saccharomyces cerevisiae*.

На основании полученных данных пациентке были назначены препараты гентамицин, флуконазол. На фоне проводимого лечения наблюдалось улучшение состояния, купирование воспалительного процесса.

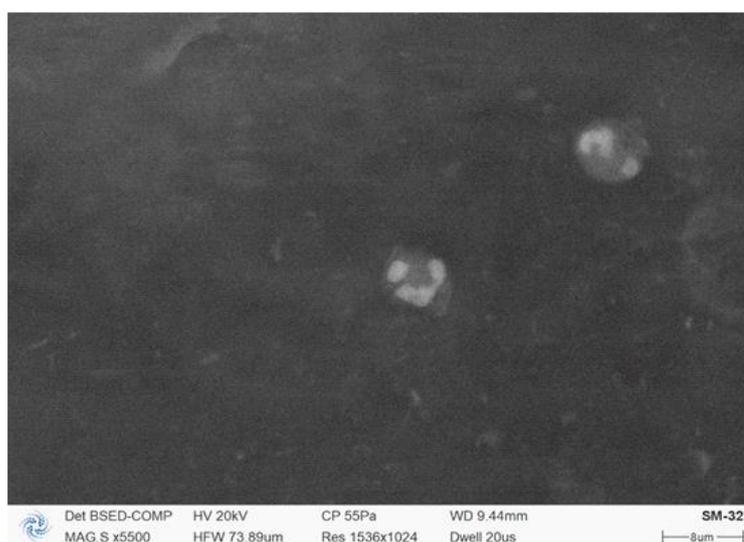


Рисунок 35 – Снимок СЭМ импрессионной пробы с ГП пациента В., визуализируются клетки полиморфноядерных лейкоцитов



Рисунок 36 – Снимок с щелевой лампы пациента В. после кератопластики

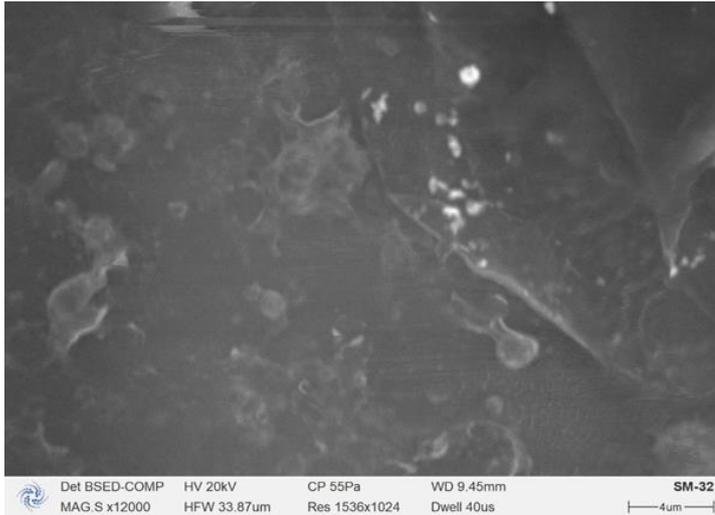


Рисунок 37 - Снимок СЭМ импрессионной пробы с ГП пациента В. после кератопластики



Рисунок 38 – Снимок колоний микроорганизмов, выросшие с ГП пациента В.

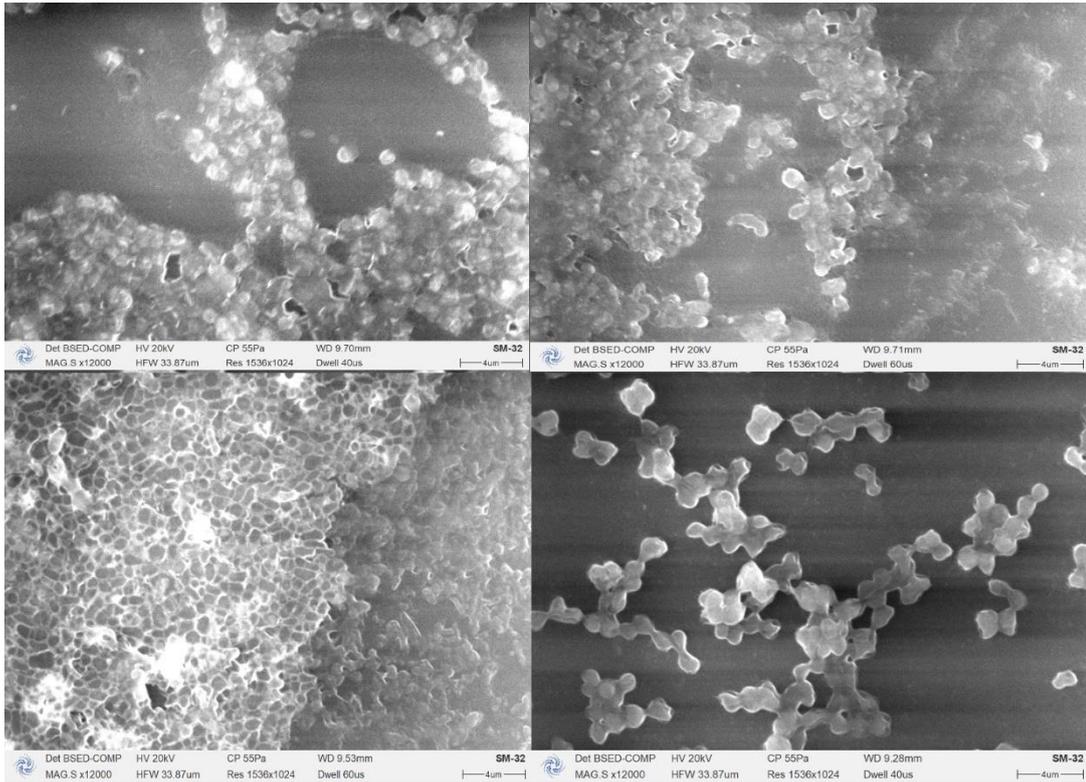


Рисунок 39 – Изображения отпечатков колоний микроорганизмов, полученные при помощи сканирующего электронного микроскопа и лантаноидного контрастирования

Исследование	Результат	Единицы	Референсные значения	Комментарий
БанкСкрин УПМ				
Общая Бакмасса рот	5.9	Ig		
Achromobacter ruhlandii	не обнаружен	Ig		
Achromobacter xylosoxidans	не обнаружен	Ig		
Acinetobacter spp.	не обнаружен	Ig		
Burkholderia spp.	не обнаружен	Ig		
Enterobacteriales	не обнаружен	Ig		
Citrobacter freundii	не обнаружен	Ig		
Citrobacter koseri	не обнаружен	Ig		
Enterobacter cloacae	не обнаружен	Ig		
Escherichia coli	не обнаружен	Ig		
Klebsiella pneumoniae + Klebsiella oxytoca	не обнаружен	Ig		
Klebsiella pneumoniae	не обнаружен	Ig		
Morganella morganii	не обнаружен	Ig		
Proteus spp.	не обнаружен	Ig		
Serratia marcescens	не обнаружен	Ig		
Enterococcus spp.	не обнаружен	Ig		
Haemophilus spp.	не обнаружен	Ig		
Haemophilus influenzae	не обнаружен	Ig		
Pseudomonas aeruginosa	не обнаружен	Ig		
Staphylococcus spp.	5.8	Ig	76-100%	
Staphylococcus aureus	не обнаружен	Ig		
Stenotrophomonas maltophilia	не обнаружен	Ig		
Streptococcus spp.	не обнаружен	Ig		
Streptococcus agalactiae	не обнаружен	Ig		
Streptococcus pneumoniae	не обнаружен	Ig		
Streptococcus pyogenes	не обнаружен	Ig		

Исследование	Результат	Единицы	Референсные значения	Комментарий
Meyerozyma guilliermondii	не обнаружен			
Candida albicans	не обнаружен			
Pichia kudriavzevii	не обнаружен			
Saccharomyces cerevisiae	обнаружен			
Candida auris	не обнаружен			
Candida tropicalis	не обнаружен			
Clavispora lusitanae	не обнаружен			
Debaryomyces hansenii	не обнаружен			
Candida dubliniensis	не обнаружен			
Candida glabrata	не обнаружен			
Candida parapsilosis	не обнаружен			
Malassezia spp.	не обнаружен			
Malassezia furfur	не обнаружен			
Kluyveromyces marxianus	не обнаружен			

Рисунок 40 – Результат ПЦР исследования материала с ГП пациента В.

Клинический пример 2

Пациент С. поступил с жалобами на боль в левом глазу, слезотечение, которые беспокоили его в течение недели. По данным анамнеза 2 недели назад был проведен лазерный двусторонний кератомилез с целью коррекции миопии. После первичного осмотра был обнаружен инфильтрат (Рисунок 41) и назначена консервативная терапия, которая включала следующие противомикробные препараты: тобрекс 0,3%, офтаквикс 0,5 %, индоколлир 0,1%, корнерегель 5%. На повторном приеме через три дня положительной динамики не было, со слов пациента острота зрения снизилась, при осмотре она составила 0,1. При повторном осмотре была выполнена импрессионная проба с поверхности инфильтрата для проведения СЭМ+ЛК и стерильным тубпфером забран материал для культурального исследования. По результатам СЭМ+ЛК были получены следующие данные: визуализировались в умеренном количестве клетки дрожжеподобных грибов и кокки (Рисунок 42). Также на твердых питательных средах наблюдался рост колоний микроорганизмов *Staphylococcus warneri*, однако на селективных питательных средах для грибов (агар Сабуро и хромогенный агар для грибов рода *Candida*) рост колоний отсутствовал. При добавлении к проводимой терапии местных и системных противогрибковых препаратов из класса производных триазола уменьшился размер инфильтрата, острота зрения улучшилась до 0,2, воспалительный процесс был купирован.



Рисунок 41 – Снимок щелевой лампы пациента С. при первичном осмотре

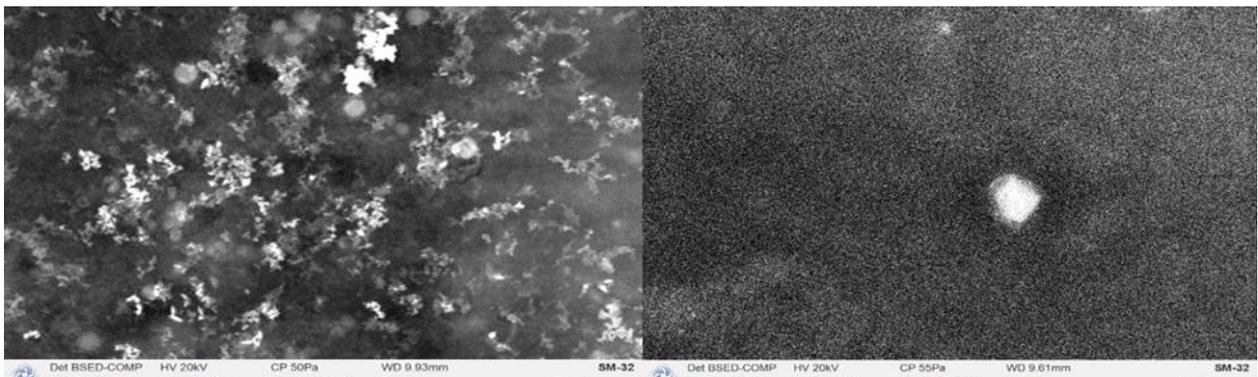


Рисунок 42 – Изображения СЭМ импрессионной пробы с ГП пациента С

ВЫВОДЫ

1. Впервые на основе репрезентативного клинического материала: 70 импрессионных проб с условно здоровой глазной поверхностью (ГП) и 90 проб с инфицированной ГП, исследованы возможности верификации микробиологического разнообразия ГП с помощью принципиально нового метода: сканирующей электронной микроскопии с лантаноидным контрастированием (СЭМ+ЛК).
2. Диагностические возможности СЭМ+ЛК, в качестве нового метода микробиологической диагностики в офтальмологии, подтверждены сравнительными данными идентификации микроорганизмов ГП по фенотипическим признакам и с помощью культурального метода с масс-спектрометрическим определением: в группе условно здоровой ГП: соответствие результатов наблюдали в 11 из 15 образцов, частичное соответствие – в 2 из 15 образцов, несоответствие – в 2 из 15 образцов; а при инфицированной ГП – в 24 из 30 образцов, в 2 из 30 образцов, в 4 из 30 образцов, соответственно.
3. Впервые на основе СЭМ+ЛК описан количественный состав микробиоты роговицы на основе фенотипических характеристик микробных клеток. В пробах с условно здоровой ГП в 86 % случаев визуализировали микроорганизмы, составляющие «нормальную» микробиоту, а частота выявления коккоморфных, палочковидных и грибоподобных микроорганизмов составила 65, 54, 14%, соответственно. При исследовании проб с инфицированной ГП микроорганизмы визуализировали в 90 % случаев: при этом частота выявления коккоморфных, палочковидных и грибоподобных микроорганизмов составила – 67, 62, 22 %, соответственно.
4. Для увеличения информативности цитологических исследований в офтальмологии с помощью СЭМ+ЛК, был создан атлас-определитель типичных для ГП микроорганизмов, включающий снимки эталонных культур.
5. Для микробиологической диагностики в офтальмологии, обоснованы расширенные температурные режимы культивирования микроорганизмов. При

исследовании проб с поверхности роговицы рекомендовано дополнительно проводить предварительное обогащение культуры микроорганизмов в жидкой среде для бактерий при 24°C в течение 5 суток, и дальнейшее культивирование на твердых питательных средах при 24°C.

6. Использование лантаноидного контрастирования при подготовке импрессионных проб с ГП позволяет визуализировать микроорганизмы в состоянии, приближенном к нативному, оценить их текущую метаболическую активность и оценить эффективность проводимого лечения при микробном кератите.

7. Разработан алгоритм экспресс-диагностики этиологического инфекционного агента при кератите с определением возможных патогенов, который включает: взятие импрессионной пробы с поверхности роговицы, лантаноидное контрастирование, СЭМ и визуализацию патогенных микроорганизмов в пробе с последующей верификацией данных на основе других методов диагностики.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В офтальмологии при МК рекомендовано использовать расширенные протоколы культурального исследования, поскольку часть микроорганизмов при стандартных условиях культивирования остается неидентифицированной.
2. Необходимо использовать все доступные лабораторные методы идентификации патогенного микроорганизма при МК. Преимущество СЭМ+ЛК заключается в том, что результат исследования готов в течение 40 минут после забора биоматериала с поверхности инфильтрата или с края язвы роговицы, то есть непосредственно из очага воспаления.
3. Метод СЭМ+ЛК импрессионной пробы с ГП может быть введен в рутинную практику офтальмологических клиник в качестве инструмента предварительной экспресс-диагностики у пациентов с МК. Предложенное исследование позволяет визуализировать не только микроорганизмы, вызывающие патологический процесс, но и синтезируемые ими защитные биопленки, собственные клетки роговицы, воспалительные клетки, участвующие в инфекционном или аутоиммунном процессе.
4. Проводить исследование необходимо до начала лечения, поскольку это может повлиять на результат.
5. Внедрение предложенной методики в клиническую практику возможно не только в офтальмологии, но и в других клинических специализациях, поскольку процесс пробоподготовки универсален и не зависит от места забора и типа образцов.

Список сокращений

АК – акантамебный кератит

ГП – глазная поверхность

ДМЖ – дисфункция мейбомиевых желез

ИКТ – инфракрасная термография

КЛ – контактные линзы

КП – кератопластика

ЛАСИК – лазерный кератомилез *in situ*

ЛК – лантаноидное контрастирование

МК – микробный кератит

ОТЕ - оперативная таксономическая единица

ПЦР – полимеразная цепная реакция

рРНК – рибосомальная РНК

РТПХ – реакция трансплантата против хозяина

СД – сахарный диабет

ССГ – синдром сухого глаза

СЭМ - сканирующей электронная микроскопия

СЭМ+ЛК – сканирующая электронная микроскопия с лантаноидным контрастированием

ЭК + ИОЛ – экстракция катаракты с имплантацией интраокулярной линзы

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Визуализация нормальной микрофлоры глазной поверхности посредством импрессионной пробы с использованием сканирующего электронного микроскопа и лантаноидного контрастирования / Кравчик М.В., Родина Е.С., Суббот А.М., Пимонова О.И., Фетцер Е.И., Новиков И.А. // Вестник офтальмологии. – 2022 – Т.138 - №6 – С. 5-13.
2. Родина, Е. С. Методы оценки микробиологического разнообразия глазной поверхности / Е. С. Родина, Е. И. Фетцер, И. А. Новиков // Вестник офтальмологии. – 2024. – Т. 140, № 3. – С. 96-108.
3. Изучение температурных условий роста микроорганизмов глазной поверхности в норме и при инфекционных кератитах / С. Э. Аветисов, Е. С. Родина, М. В. Кравчик [и др.] // Вестник офтальмологии. – 2024. – Т. 140, № 3. – С. 34-42.
4. Визуализация структуры эпителия роговицы методом сканирующей электронной микроскопии с лантаноидным контрастированием на основе Са/Nd изоморфного замещения в Са-зависимых молекулярных системах / Аветисов С.Э., Труфанов С.В., Новиков И.А., Суббот А.М., Федоров А.А. // Вестник офтальмологии. – 2016. – Т. 132 - № 6 – С. 11-19.
5. Волкович Т. К. Защитные факторы слезной жидкости и их значение в диагностике заболеваний глаз / Волкович Т. К. // Вестник Витебского государственного медицинского университета – 2008 – Т.7 - №3 – С. 104-109.
6. Лантаноидное контрастирование как ускоренная технология пробоподготовки микробиологических препаратов для сканирующей электронной микроскопии / Чеботарь И.В., Новиков И.А., Суббот А.М., Маянский Н.А. // Современные технологии в медицине. – 2017, №3. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/lantanoidnoe-kontrastirovanie-kak-uskorennaya-tehnologiya-probopodgotovki-mikrobiologicheskikh-preparatov-dlya-skaniruyushey> (дата обращения: 24.07.2024).

7. Методики клинических лабораторных исследований: справочное пособие: в 3 т. Под ред. Меньшикова В.В. – Москва : Лабора, 2009. – Т.3. – 880 с. – ISBN 978-5-3032-84-03-3. – Текст непосредственный.

8. Новые возможности экспресс-диагностики сложно культивируемых возбудителей инфекционных кератитов / Кравчик М.В., Зайцев А.В., Каспарова Евг.А., Родина Е.С., Суббот А.М., Новиков И.А. // Точка зрения. Восток-запад. – 2023. – № 3. – С.17-21.

9. Околов, И. Н. Нормальная микрофлора конъюнктивы у офтальмохирургических пациентов / И. Н. Околов, П. А. Гурченко, А. В. Вохмяков // Офтальмологические ведомости. – 2008. – Т. 1, № 3. – С. 18-21.

10. Практические рекомендации по преаналитическому этапу микробиологических исследований. Часть I. Бактериологические исследования / Алиева Е.В., Кафтырева Л.А., Макарова М.А., Тартаковский И.С. // Лабораторная служба. – 2020 – Т.9 - №2 – С. 45-66.

11. Российская Федерация. Федеральные клинические рекомендации по офтальмологии. Утверждены Министерством здравоохранения в 2017 г. Бактериальные язвы роговицы / Общероссийская общественная организация «Ассоциация врачей-офтальмологов» России: офиц. сайт. URL: <https://eyepress.ru/section.aspx?4265> (дата обращения 24.07.2024).

12. Российская Федерация. Федеральные клинические рекомендации по офтальмологии. Утверждены Министерством здравоохранения в 2021 г. Конъюнктивит / Общероссийская общественная организация «Ассоциация врачей-офтальмологов» России: офиц сайт. URL: <https://eyepress.ru/section.aspx?7943>(дата обращения 24.07.2024).

13. Сканирующая электронная микроскопия с суправитальным контрастированием в экспресс-диагностике заболеваний глаза и придаточного аппарата / И. А. Новиков, М. В. Кравчик, О. А. Пак [и др.] // Вестник офтальмологии. – 2023. – Т. 139, № 3-2. – С. 136-144.

14. Создание атласа эталонных культур для оценки микробиологического статуса глазной поверхности методом сканирующей электронной микроскопии с

лантаноидным контрастированием / Е. С. Родина, И. В. Чеботарь, М. В. Кравчик [и др.] // Современные технологии в офтальмологии. – 2022. – № 3(43). – С. 241-247.

15. Суправитальное контрастирование лантаноидами для визуализации структуры биологических образцов на сканирующем электронном микроскопе / Новиков И.А., Суббот А.М., Федоров А.А., Грибоедова И.Г., Антонов Е.Н., Вахрушев И.В.// Гены и клетки. – 2015. - №2 – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/supravitalnoe-kontrastirovanie-lantanoidami-dlya-vizualizatsii-struktury-biologicheskikh-obraztsov-na-skaniruyuschem-elektronnom> (дата обращения: 24.07.2024).

16. Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологической лаборатории: Методические указания МУ 4.2.2039-05. 2006. Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора.

17. A comparative study of risk factors for corneal infection in diabetic and non-diabetic patients / B. Wang, S. Yang, H.L. Zhai, [et. al.] // International journal of ophthalmology. – 2018. – Vol.11, №1 – P. 43–47.

18. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology / J.M. Miller, M.J. Binnicker, S. Campbell [et. al.] // Clinical Infectious Diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2018. Vol.67, №6. e1–e94. URL: <https://doi.org/10.1093/cid/ciy381>

19. A New Perspective on Dry Eye Classification: Proposal by the Asia Dry Eye Society / K. Tsubota, N. Yokoi, H. Watanabe, [et. al.] // Eye & contact lens. – 2020. – Vol.46, Suppl 1, №1 – P. 2–13.

20. A review of combination antimicrobial therapy for Enterococcus faecalis bloodstream infections and infective endocarditis / M. Beganovic, M.K. Luther, L.B. Rice, [et. al.] // Clinical Infectious Diseases. – 2018 – Vol. 67, №2 – P. 303-309.

21. Amend J.P. Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic Archaea and Bacteria / J.P. Amend, E.L. Shock // FEMS microbiology reviews. – 2001. – Vol. 25, №2. – P.175-243.

22. An Ocular Commensal Protects against Corneal Infection by Driving an Interleukin-17 Response from Mucosal $\gamma\delta$ T Cells / St. A. J. Leger, J. V. Desai, R. A. Drummond, [et. al.] // *Immunity*. – 2017. – Vol. 47, №1 – P. 148–158.
23. An, Q. Ocular surface microbiota dysbiosis contributes to the high prevalence of dry eye disease in diabetic patients / Q. An, H. Zou // *Critical reviews in microbiology*. – 2022. – Vol. 49, № 6 – P. 1–10.
24. Ando, N. Fungal flora of the conjunctival sac / N. Ando, K. Takatori // *American journal of ophthalmology*. – 1982 – Vol. 94, № 1 – P. 67–74. [https://doi.org/10.1016/0002-9394\(82\)90193-3](https://doi.org/10.1016/0002-9394(82)90193-3)
25. Antimicrobial resistance trends in bacterial keratitis over 5 years in Sydney, Australia / M. Cabrera-Aguas, P. Khoo, C. R. R. George, [et. al.] // *Clinical & experimental ophthalmology*. – 2020. – Vol. 48, №2 – P. 183–191.
26. Bacterial Keratitis: Isolated Organisms and Antibiotic Resistance Patterns in San Francisco / M.Y. Peng, V. Cevallos, S. McLeod [et. al.] // *Cornea*. – 2018. – Vol. 37, №1 – P. 84–87.
27. Bacterial profile of ocular infections: a systematic review / M. Teweldemedhin, H. Gebreyesus, A.H. Atsbaha, [et. al.] // *BMC ophthalmology*. 2017. Vol. 17, №1. 212. URL: <https://doi.org/10.1186/s12886-017-0612-2>
28. Bagley S.T. Habitat association of Klebsiella species / S.T. Bagley // *Infection Control & Hospital Epidemiology*. – 1985 – Vol. 6, № 2 – P. 52-58.
29. Balows A. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Eighth Edition. *American Journal of Public Health*. 1975; 65(3), 315.
30. Behlau, I. Microbial biofilms in ophthalmology and infectious disease / I. Behlau, M. S. Gilmore // *Archives of ophthalmology*. – 2008. – Vol. 126, № 11 – P. 1572–1581.
31. Challenges in Acanthamoeba Keratitis: A Review / G. Varacalli, A. Di Zazzo, T. Mori, [et. al.] // *Journal of clinical medicine*. 2021. Vol. 10, №5. 942. URL: <https://doi.org/10.3390/jcm10050942>

32. Changes in the Eye Microbiota Associated with Contact Lens Wearing / H. Shin, K. Price, L. Albert, [et. al.] // *mBio*. 2016. Vol. 7, №2: e00198. URL: <https://doi.org/10.1128/mBio.00198-16>
33. Characterization of fungal microbiota on normal ocular surface of humans / Wang Y, Chen H, Xia T, [et. al.] // *Clinical microbiology and infection*. 2020. Vol.26,№1.P.123.e9–123.e13. URL:<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.05.011>
34. Characterization of Ocular Surface Microbial Profiles Revealed Discrepancies between Conjunctival and Corneal Microbiota / A. Matysiak, M. Kabza, J.A. Karolak [et. al.] // *Pathogens*. 2021. Vol.10,№4. URL: <https://doi.org/10.3390/pathogens10040405>
35. Combined *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* infection in a patient with oesophageal perforation / Y. La Jeon, J.J. Yang, M.J. Kim, [et. al.] // *Journal of medical microbiology*. – 2012. Vol. 61, №12 – P. 1766-1769.
36. Commensal microflora in human conjunctiva; characteristics of microflora in the patients with chronic ocular graft-versus-host disease / E. Shimizu, Y. Ogawa, Y. Saijo, [et. al.] // *The ocular surface*. – 2019. – Vol.17, №2 – P. 265–271.
37. Comparative genomic analysis of pathogenic and probiotic *Enterococcus faecalis* isolates, and their transcriptional responses to growth in human urine. H.C. Vebø, M. Solheim, L. Snipen, [et. al.] // *PloS one*. 2010. Vol. 5, № 8. e12489. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012489>
38. Comparative study of Gram stain, potassium hydroxide smear, culture and nested PCR in the diagnosis of fungal keratitis / P. Badiie, M. Nejabat, A. Alborzi, [et. al.] // *Ophthalmic research*. – 2010 – Vol. 44, № 4 – P. 251-256.
39. Comparison of microbiome isolated from the conjunctiva, contact lens and lens storage case of symptomatic and asymptomatic contact lens users / L. Raksha, G.B. Shantala, N. Gangashettappa, [et. al.] // *Iran J Microbiol*. – 2019. – Vol.11, №5 – P. 349-356.
40. Conjunctival bacterial flora and antibiotic resistance pattern in patients undergoing cataract surgery / T.E. Arantes, R.F. Cavalcanti, M.deF. Diniz, [et. al.] // *Arquivos brasileiros de oftalmologia*. – 2006 – Vol. 69, № 1 – P. 33–36.

41. Current Evidence on the Ocular Surface Microbiota and Related Diseases. / F. Petrillo, D. Pignataro, M.A. Lavano [et. al.] // *Microorganisms*. 2020. Vol.8, №7. 1033. URL: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071033>
42. De Craene, S. Assessment of Confocal Microscopy for the Diagnosis of Polymerase Chain Reaction-Positive Acanthamoeba Keratitis: A Case-Control Study / S. De Craene, J. Knoeri, C. Georgeon // *Ophthalmology*. – 2018 – Vol.125, № 2 – P. 161–168.
43. Diagnosis of Fungal Keratitis in Low-Income Countries: Evaluation of Smear Microscopy, Culture, and In Vivo Confocal Microscopy in Nepal / J. J. Hoffman, R. Yadav, S. D. Sanyam, [et. al.] // *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*. 2022. Vol.8, №9 , 955. URL: <https://doi.org/10.3390/jof8090955>
44. Diagnostic Approach to Ocular Infections Using Various Techniques From Conventional Culture to Next-Generation Sequencing Analysis / H. Eguchi, F. Hotta, T. Kuwahara [et. al.] // *Cornea*. – 2017 – Vol.36, № 1 – P. 46-52.
45. Distribution and incidence of viridans streptococcal species in routine clinical specimens / K.L. Ruoff, J.A. Fishman, S.B. Calderwood, [et. al.] // *American journal of clinical pathology*. – 1983 – Vol. 80, № 6 – P. 854-858.
46. Diversity of bacteria at healthy human conjunctiva / Q. Dong, J.M. Brulc, A. Iovieno [et. al.] // *Investigative ophthalmology & visual science*. – 2011. – Vol.52, №8 – P. 5408–5413.
47. Durand M.L. Endophthalmitis / M.L. Durand // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2013 – Vol. 19, № 3 – P. 227-234.
48. Early diagnosis of mycotic keratitis: predictive value of potassium hydroxide preparation / S. Sharma, M. Silverberg, P. Mehta, [et. al.] // *Indian journal of ophthalmology*. – 1998. – Vol.46, №1 – P. 31–35.
49. Effect of clinical parameters on the ocular surface microbiome in children and adults / K.M. Cavuoto, R. Mendez, D. Miller, [et. al.] // *Clinical ophthalmology*. – 2018. – Vol. 12 – P. 1189–1197.

50. Evaluation of Calcofluor staining in the diagnosis of fungal corneal ulcer / J. Chander, A.Chakrabarti, A. Sharma [et. al.] // *Mycoses*. – 1993. – Vol. 36, №7-8 – P. 243–245.
51. Evaluation of normal ocular bacterial flora with two different culture media / C.T. Moeller, B.C. Branco, M.C. Yu, [et. al.] // *Canadian journal of ophthalmology. Journal canadien d'ophtalmologie*. – 2005. – Vol.40, №4 – P. 448–453.
52. Evaluation of three PCR assays for the detection of fungi in patients with mycotic keratitis / P.K. Balne, A.K. Reddy, M. Kodiganti, [et. al.] // *The British journal of ophthalmology*. – 2012. – Vol. 96, № 6 – P. 911-912.
53. Exploring the Healthy Eye Microbiota Niche in a Multicenter Study / D. Borroni, A. Paytuví-Gallart, W. Sanseverino, [et. al.] // *International journal of molecular sciences*. 2022. Vol.23, №18. 10229. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms231810229>
54. Foster, C.S. Scanning electron microscopy of conjunctival surfaces in patients with ocular cicatricial pemphigoid / C.S. Foster, C.D. Shaw, P.A. Wells // *American journal of ophthalmology*. – 1986. – Vol.102, №5 – P. 584–591.
55. Frequency and significance of fungal isolations from conjunctival sac and their role in ocular infections / S.C. Sehgal, S. Dhawan, S. Chhiber, [et. al.] // *Mycopathologia*. – 1981. – Vol.73, №1 – P. 17–19.
56. From Animaculum to single molecules: 300 years of the light microscope / Wollman AJ, Nudd R, Hedlund EG, [et. al.] // *Open biology*. 2015. Vol.5, №4. 150019. URL: <https://doi.org/10.1098/rsob.150019>
57. Fungal flora of the conjunctival sac in health and disease. Influence of topical and systemic steroids / J. Williamson, A.M. Gordon, R. Wood, [et. al.] // *The British journal of ophthalmology*. – 1968. Vol. 52, №2 – P. 127–137.
58. Fungal keratitis caused by *Laetisaria arvalis* / L. Dudeja, L. Jeganathan, N. V. Prajna [et. al.] // *Indian journal of medical microbiology*. – 2018. – Vol.36, №1 – P. 140–142.
59. Genomic Approach to Investigating Ocular Surface Microorganisms: Monitoring Core Microbiota on Eyelid Margin with a Dot hybridization Assay / M.T.

Kuo, T.L. Chao, S.F. Kuo [et. al.] // International journal of molecular sciences. – 2020. – Vol.21, №21 – P. 82-99.

60. Genus Distribution of Bacteria and Fungi Associated with Keratitis in a Large Eye Center Located in Southern China / L. Lin, Lan, W., Lou, B. [et. al.] // Ophthalmic epidemiology. – 2017. – Vol.24, №2 – P. 90–96.

61. Gomes, J.Á.P. Ocular Surface Microbiome in Health and Disease / J.Á.P. Gomes, L. Frizon, V.F. Demeda // Asia-Pacific journal of ophthalmology (Philadelphia). – 2020. – Vol.9, №6 – P. 505–511.

62. Hotta, F. Microbiome analysis of contact lens care solutions and tear fluids of contact lens wearers: Possible involvement of streptococcal antigens in allergic symptoms related to contact lens wear / F. Hotta, H. Eguchi, H. Nakayama-Imahiji [et. al.] // International journal of molecular medicine. – 2020. – Vol.46, №4 – P. 1367–1376.

63. Impact of implementation of polymerase chain reaction on diagnosis, treatment, and clinical course of Acanthamoeba keratitis / M. Roth, A. Balasiu, L. Daas, [et. al.] // Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology. – 2023. – Vol.261, №7 – P. 1951–1959.

64. Infectious keratitis: an update on epidemiology, causative microorganisms, risk factors, and antimicrobial resistance / D.S.J. Ting, C.S. Ho, R. Deshmukh, [et. al.] // Eye (London, England). – 2021. – Vol.35, №4 – P. 1084–1101.

65. Infective Endocarditis Caused by Pseudomonas luteola in a Pediatric Patient: A Case Report and Literature Review / A.A. Alhalimi, L.T. AlShammari, A.K. Al-Qurayn, [et. al.] // The American Journal of Case Reports. 2022. Vol.23. e935743-935741. URL: <https://doi.org/10.12659/AJCR.935743>

66. Inhibitory Effect of Short-Term Palpebral Margin Cleaning with Antibiotic Eye Drops on Ocular Surface Flora before Cataract Extraction: A New Preoperative Antibacterial Method / X.Y. Chen, H.Y. Cai, Y.N. Liu, [et. al.] // Chinese medical sciences journal. – 2022. – Vol. 37, № 2 – P. 118-126.

67. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system / N. Shi, N. Li, X. Duan, [et. al.] // Military Medical Research. 2017. Vol.4, №14. URL: <https://doi.org/10.1186/s40779-017-0122-9>

68. John, G.K. The Gut Microbiome and Obesity / G.K. John, G.E. Mullin // *Current oncology reports*. 2016. Vol.18, №7. URL: <https://doi.org/10.1007/s11912-016-0528-7>
69. Keratitis due to *Fusarium langsethiae*: clinical profile, molecular identification, and susceptibility to antifungals / V. Vasantha Ruban, P. Geraldine, J. Kaliamurthy [et. al.] // *Mycopathologia*. – 2015. – Vol. 179, №5-6 – P. 453–458.
70. Kittipibul, T. Comparison of the ocular microbiome between chronic Stevens-Johnson syndrome patients and healthy subjects / T. Kittipibul, V. Puangsrichareern, T. Chatsuwan // *Scientific reports*. 2020. Vol.10, №1: 4353. URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60794-w>
71. Leal, S.M. Jr., Rodino KG, Fowler WC, Gilligan PH. Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Diagnosis of Ocular Infections / S.M. Jr. Leal, K.G. Rodino, W.C. Fowler, [et. al.] // *Clinical microbiology reviews*. 2021. Vol.34, №3. e0007019. URL: <https://doi.org/10.1128/CMR.00070-19>
72. Mechanistic investigations of diabetic ocular surface diseases / Zhou, Q., Yang, L., Wang, Q., [et. al.] // *Frontiers in endocrinology*. 2022. Vol. 13/ 1079541. URL: <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1079541>
73. Metagenomic Analysis Reveals the Heterogeneity of Conjunctival Microbiota Dysbiosis in Dry Eye Disease / Q. Liang, J. Li, Y. Zou [et. al.] // *Frontiers in cell and developmental biology*. 2021. Vol.9:731867. URL: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.731867>
74. Microbial keratitis at a referral center in Brazil / A.J. Cariello, R. M. Passos, M.C. Yu, [et. al.] // *International ophthalmology*. – 2011. – Vol. 31, № 3 – P. 197–204.
75. Microbiological Characteristics of Ocular Surface Associated With Dry Eye in Children and Adolescents With Diabetes Mellitus / Z. Chen, Y. Jia, Y. Xiao, [et. al.] // *Investigative ophthalmology & visual science*. 2022. Vol. 63, №13. URL: <https://doi.org/10.1167/iovs.63.13.20>
76. Microscopic evaluation, molecular identification, antifungal susceptibility, and clinical outcomes in fusarium, *Aspergillus* and dematiaceous keratitis / D.U. Gajjar,

A.K. Pal, B.K. Ghodadra [et. al.] // BioMed research international. 2013. URL: <https://doi.org/10.1155/2013/605308>

77. Mun, Y. Ten-year analysis of microbiological profile and antibiotic sensitivity for bacterial keratitis in Korea / Y. Mun, M.K. Kim, J.Y. Oh // PLoS One. 2019. Vol.14, №3. e0213103. URL: <https://doi:10.1371/journal.pone.0213103>

78. Ocular Surface Microbiota in Contact Lens Users and Contact-Lens-Associated Bacterial Keratitis / J. Andersson, J.K. Vogt, M.D. Dalgaard, [et. al.] // Vision (Basel). – 2021 – Vol. 5, № 2. URL: <https://doi.org/10.3390/vision5020027>

79. Ocular Surface Microbiota in Diabetic Patients With Dry Eye Disease / Zhang, Z., Zou, X., Xue, W., [et. al.] // Investigative ophthalmology & visual science. 2021. Vol.62, № 12. Is. 13. URL: <https://doi.org/10.1167/iovs.62.12.13>

80. Ocular surface microbiota in patients with aqueous tear-deficient dry eye / J. Andersson, J.K. Vogt, M.D. Dalgaard, [et. al.] // The ocular surface. – 2021. – Vol. 19 – P. 210–217.

81. Polymerase chain reaction-guided diagnosis of mycotic keratitis: a prospective evaluation of its efficacy and limitations / S. Vengayil, A. Panda, G. Satpathy, [et. al.] // Investigative ophthalmology & visual science. – 2009. – Vol.50, №1 – P. 152-156.

82. Rathinavelu, S. Acinetobacter lwoffii infection and gastritis / S. Rathinavelu, Y. Zavros, J.L. Merchant // Microbes and Infection. – 2003 – Vol. 5, № 7 – P. 651-657.

83. Reiff, C. Inflammatory bowel disease, gut bacteria and probiotic therapy / C. Reiff, D. Kelly // International journal of medical microbiology : IJMM. – 2010. – Vol.300, №1 – P. 25–33.

84. Relationship between climate, disease severity, and causative organism for contact lens-associated microbial keratitis in Australia / F. Stapleton, L.J. Keay, P.G. Sanfilippo, [et. al.] // American journal of ophthalmology. – 2007. – Vol.44, №5 – P. 690–698.

85. Risk factors for corneal infiltrative events during continuous wear of silicone hydrogel contact lenses / L. Szczotka-Flynn, J.H. Lass, A. Sethi, [et. al.] // Investigative ophthalmology & visual science. – 2010. – Vol.51, №11 – P. 5421–5430.

86. Sagerfors, S. Infectious keratitis: isolated microbes and their antibiotic susceptibility pattern during 2004-2014 in Region Örebro County, Sweden / S. Sagerfors, B. Ejdervik-Lindblad, B. Söderquist // *Acta ophthalmologica*. – 2020. – Vol.98, №3 – P. 255–260.
87. Satish, K. Bacterial flora in the conjunctiva among the patients undergoing cataract surgery / K Satish, T.J. Chandra // *International Journal of Research in Medical Sciences*. – 2019. – Vol.7, №4 – P. 1208–1211.
88. Scanning electron microscopy applied to impression cytology for conjunctival damage from glaucoma therapy / G. Cennamo, R. Forte, S. Del Prete, [et. al.] // *Cornea*. – 2013. – Vol. 32, № 9 – P. 1227–1231.
89. Seasonal, geographic, and antimicrobial resistance patterns in microbial keratitis: 4-year experience in eastern Pennsylvania / N. Ni, E. M. Nam, K.M. Hammersmith, [et. al.] // *Cornea*. – 2015. – Vol.34, №3 – P. 296–302.
90. Seifert, H. *Micrococcus luteus* endocarditis: case report and review of the literature. H. Seifert, M. Kaltheuner, F. Perdreau-Remington // *Zentralblatt für Bakteriologie : international journal of medical microbiology*. – 1995. – Vol.282, №4 – P. 431-435.
91. Sharma, S. Patient characteristics, diagnosis, and treatment of non-contact lens related *Acanthamoeba* keratitis / S. Sharma, P. Garg, G.N. Rao // *The British journal of ophthalmology*. – 2000. – Vol.84, №10 – P. 1103–1108.
92. Singh, L. *Klebsiella oxytoca*: An emerging pathogen / L. Singh, M. Cariappa, M. Kaur // *Medical journal armed forces india*. – 2016. Vol. 72 – P. 59-61.
93. Staley, J.T. *Enhydrobacter aerosaccus* gen. nov., sp. nov., a Gas-Vacuolated, Facultatively Anaerobic, Heterotrophic Rod / J.T. Staley, R.L. Irgens, D.J. Brenner [et. al.] // *International Journal of Systematic Bacteriology*. – 1987 – Vol.37, №3 – P. 289-291.
94. Study of biofilm formation in bacterial isolates from contact lens wearers / L. Raksha, N. Gangashettappa, G.B. Shantala, [et. al.] // *Indian journal of ophthalmology*. – 2020. – Vol.68, №1 – P. 23–28.

95. Temporal Stability and Composition of the Ocular Surface Microbiome / J. Ozkan, S. Nielsen, C. Diez-Vives [et. al.] // *Scientific reports*. 2017. Vol. 7, №1. 9880. URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10494-9>
96. The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop. 2007. The ocular surface. Vol.5, №2. P. 75–92. URL: [https://doi.org/10.1016/s1542-0124\(12\)70081-2](https://doi.org/10.1016/s1542-0124(12)70081-2)
97. The Human Microbiome and Cancer / S.V. Rajagopala, S. Vashee, L.M. Oldfield [et. al.] // *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*. – 2017 – Vol.10, №4 – P. 226-234.
98. The ocular microbiome and microbiota and their effects on ocular surface pathophysiology and disorders / P. Aragona, C. Baudouin, J.M. Benitez Del Castillo, [et. al.] // *Survey of ophthalmology*. – 2021 – Vol. 66, № 6 – P. 907–925.
99. The persistent dilemma of microbial keratitis: Global burden, diagnosis, and antimicrobial resistance / L. Ung, P. J. M. Bispo, S.S. Shanbhag, [et. al.] // *Survey of ophthalmology*. – 2019. – Vol.64, №3), P. 255–271.
100. The role of the calcofluor white staining in the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis / C. Elhardt, R. Schweikert, L. M. Hartmann [et. al.] // *Journal of ophthalmic inflammation and infection*. 2023. Vol. 13, № 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s12348-023-00345-2>
101. The safety of two *Bacillus* probiotic strains for human use / I.B. Sorokulova, I.V. Pinchuk, M. Denayrolles, I.G. Osipova, [et. al.] // *Digestive diseases and sciences*. – 2008 – Vol.53, №4 – P.954-963.
102. Thermophiles: Physiology, Metabolism, Enzymology, and Adaptation Mechanisms. Physiology, Genomics, and Biotechnological Applications of Extremophiles / A.V. Mangrola, R.K. Patel, P. Dudhagara, H. Gandhi, A. Ghelani, K.R. Jain, H. Shah, V.A. Mevada // IGI Global. – 2022. p. 65-93 <https://doi.org/10.4018/978-1-7998-9144-4.ch004>
103. Trends in Infectious Keratitis in Taiwan: An Update on Predisposing Factors, Microbiological and Antibiotic Susceptibility Patterns / J.J. Wang, C.H. Lai,

C.Y. Chen [et. al.] // *Diagnostics*. 2022. Vol.12, №9.2095. URL: <https://doi.org/10.3390/diagnostics12092095>

104. Trends of Bacterial Keratitis Culture Isolates in Jerusalem; a 13- Years Analysis / M. Politis, D. Wajnsztajn, B. Rosin, [et. al.] // *PloS one*. 2016. Vol.11, №11. e0165223. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165223>

105. Use of 18S rRNA gene-based PCR assay for diagnosis of acanthamoeba keratitis in non-contact lens wearers in India / G. Pasricha, S. Sharma, P. Garg [et. al.] // *Journal of clinical microbiology*. – 2003. – Vol.41, №7 – P. 3206–3211.

106. Use of lactophenol cotton blue mounts of corneal scrapings as an aid to the diagnosis of mycotic keratitis / P.A. Thomas, T. Kuriakose, M.P. Kirupashanker, [et. al.] // *Diagnostic microbiology and infectious disease*. – 1991. – Vol.14, №3 – P. 219–224.