

Родина Елизавета Сергеевна

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

3.1.5. Офтальмология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

кандидат медицинских наук

Фетцер Елена Игоревна

Официальные оппоненты:

Майчук Дмитрий Юрьевич, доктор медицинских наук, Федеральное государственное автономное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, заведующий отделом терапевтической офтальмологии

Труфанов Сергей Владимирович, доктор медицинских наук, ООО «Наше здоровье», заместитель генерального директора по научной работе

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ

Защита состоится 17 февраля 2025 в 14-00 часов на заседании диссертационного совета при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт глазных болезней им. М.М. Краснова» по адресу: 119021, г. Москва, ул. Россолимо, д. 11, корп. А, Б

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте www.niigb.ru. Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт глазных болезней им. М.М. Краснова»

Автореферат диссертации разослан « ____ » _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук

М.Н. Иванов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Исследование микробиоты (сообщества микробов организма, которые представляют собой резидентную микрофлору) проводится уже более 300 лет. Вплоть до начала 2000-х годов основным методом исследования микробиоты глазной поверхности (ГП) являлся культуральный метод. Значительно позже появилось понятие микробиома (совокупность геномов микроорганизмов, составляющих микробиоту), оно было введено сравнительно недавно в 2001 г., а первое исследование микробиома ГП методом секвенирования рДНК было проведено в 2011г., что расширило представление о микробиальном сообществе ГП, так как количество микроорганизмов, выявляемых с помощью метагеномного исследования, было значительно выше, чем разнообразие, которое получали с помощью культурального метода.

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. Большое внимание уделяется исследованию резидентных микробных сообществ для поиска взаимосвязи между изменением количественного и качественного состава микробиоты и возникновением патологических состояний. Поиски такой взаимосвязи происходят 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 данных о составе микрофлоры ГП приводит к тому, что до сих пор нет однозначного мнения по поводу наличия основной микробиоты, характерной именно для ГП. Наряду с этим не существует и однозначного мнения о том, какое состояние ГП можно назвать “нормальным”. В большинстве случаев термин «нормальная

микрофлора ГП» определяет состав микрофлоры в отсутствие заболеваний непосредственно органа зрения и придаточного аппарата.

Проблема верификации микробного сообщества ГП существует не только в области фундаментальных исследований микробиоты и микробиома. В широкой клинической практике офтальмолог также нуждается в методах, позволяющих быстро выявить инфекционный агент при острых заболеваниях ГП, в том числе - при микробных кератитах (МК). Своевременное выявление патогена, вызывающего МК остается серьезной проблемой в офтальмологии. Стандартом верификации инфекционного агента остается культуральное исследование биологических образцов с ГП (длительность ожидания результата – 5–7 дней). Однако лечение обычно назначается эмпирически до получения результатов бактериологического исследования, основываясь на характерных клинических признаках. Во многих случаях МК при несвоевременной диагностике и лечении, назначенном без учета этиологического фактора приводит к выраженному снижению остроты зрения и инвалидизации, а также к необходимости оперативного вмешательства на переднем отрезке глаза (кератопластика (КП)).

Большинство ученых приходят к выводу о том, что для успешной своевременной идентификации микроорганизмов, вызывающих воспаление ГП, необходимо использовать все доступные методы исследования. В таком случае у клиницистов увеличивается сомнение в достоверности получаемых результатов, поскольку встречаются случаи несовпадения данных разных методов исследования.

В настоящей работе предпринята попытка адаптировать сканирующую электронную микроскопию с лантаноидным контрастированием (СЭМ+ЛК) для микробиологического анализа импрессионной пробы, полученной с ГП, и возможность использования совокупности методов в качестве превентивного референса, который позволит верифицировать результаты прочих микробиологических тестов.

Цель исследования: совершенствование верификации микробиологического разнообразия ГП в норме и при воспалительных заболеваниях роговицы посредством применения метода СЭМ+ЛК.

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 кератитах.

5. Впервые метод СЭМ+ЛК предложен в качестве метода верификации данных о микробиологическом разнообразии, получаемом посредством других методов исследования.

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, сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и бесконтактной инфракрасной термографии (ИКТ). Диссертационное исследование выполнено в соответствии с принципами научного исследования. Работа реализована в дизайне одномоментного наблюдательного клинического исследования с использованием клинических и аналитических методов.

Положения, выносимые на защиту

1. При использовании СЭМ+ЛК в качестве метода визуализации биологического материала ГП, обнаруживаемые в нём 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 микробного кератита, 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).

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 СЭМ-изображений и их интерпретации.

Внедрение результатов работы в практику

Полученные в ходе настоящего исследования результаты и разработанные методики успешно внедрены и активно применяются в клинической работе в ФГБНУ «НИИ глазных болезней имени М.М.Краснова» и в 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).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Из базы снимков, полученных в лаборатории фундаментальных исследований ФГБНУ «НИИ ГБ им. М.М. Краснова» методом СЭМ+ЛК контрастированием было отобрано 45 изображений при стандартном разрешении 58,1 нм/рх при 1024x718 рх и 452 изображений со стандартным разрешением 21 нм/рх при 1024x768 рх 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*.

В последующем рубрикатор атласа-определителя с перечисленными микроорганизмами использовался для верификации микробиологического разнообразия ГП в норме и при кератите. Визуализированные в импрессионной пробе микроорганизмы оценивались по фенотипическим характеристикам и особенностям, проявляющимся при окрашивании лантаноидами.

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 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 пациентов участников из первой группы, что позволило выявить наличие у части из них 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 группа 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 ГП и 50 участников с кератитом, соответственно.

Алгоритм забора биоматериала (импрессионная цитологическая проба) и пробоподготовки для сканирующей электронной микроскопии. При заборе биологического материала с ГП местную анестезию не проводили. С помощью дугообразно изогнутого адгезивного стерильного гибкого стекла из полистирола осуществляли взятие материала с ГП. Полученную таким образом импрессионную пробу естественно подсушивали 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 обрабатывали реактивами из набора для контрастирования BioREE-B в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя (ООО «Глаукон», Россия). Образцы препаратов после лантаноидного контрастирования закрепляли на предметном столике микроскопа посредством адгезивной углеродной ленты (Nisshin EM, Co., Япония) и размещали в камере СЭМ (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 обратнорассеянных электронов (BSE)

Забор материала для культурального исследования. Забор биологического материала с ГП производили стерильным зонд-тампоном при

первичном осмотре. При наличии инфильтрата роговицы материал отбирали с поверхности инфильтрата, в противном случае – с бульбарной конъюнктивы. Забор пробы выполняли последовательно трижды.

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 ГП, 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.

Бесконтактную инфракрасную термография (ИКТ) проводили 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 выполняли с использованием температурной шкалы с автоматическим распознаванием горячей/холодной точки.

Результаты собственных исследований

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. На уровне царства определение принадлежности визуализированного объекта производили, основываясь на размерах, контуре оболочек, контрастности.

Царство бактерий. Первым показателем, который оценивали, были размеры клеток, средние размеры бактерий следующие длина – 1,5–3 мкм, ширина – 0,4–1,5 мкм. По размеру клетки бактерий 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 их форма (сферическая, палочковидная или промежуточная). Для разделения групп на подгруппы использовали характеристики контура микроорганизма: его очертания и контрастность по отношению к фону. Также учитывали такие признаки, как наличие спор, очертания жгутиков, подвижность микроорганизмов. Были выделены и описаны следующие группы микроорганизмов: коккоморфные бактерии (конституциональные кокки – *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus epidermidis*; *Rothia mucilaginosa*); бактерии и промежуточной формы (коккобациллы и полиморфные); палочковидные бактерии с умеренным удлинением без образования спор; палочковидные бактерии с умеренным удлинением спорообразующие (*Bacillus cereus*); экстремально

удлиненные и нитевидные бактерии (*Mycobacterium abscessus*). В группе бактерий промежуточной формы выделены подгруппы: конституциональные диплококки с выраженной двойной или одинарной оболочкой (*Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*); колониальные коккобациллы (*Acinetobacter baumannii*); конституциональные диплококки, с выраженной двойной оболочкой (*Streptococcus pneumoniae*). Группу палочковидных бактерий с умеренным удлинением без образования спор, основываясь на контурах внешних оболочек, разделили на подгруппы: палочковидные бактерии с размытыми контурами внешних оболочек (жгутиконосцы – *Achromobacter xylosoxidans*; *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*; *Serratia marcescens*; без жгутиков, с полярными жгутиками – *Klebsiella pneumoniae*; *Shigella sonnei*, *Stenotrophomonas maltophilia*); палочковидные бактерии с четкими контурами внешних оболочек (без полярных депозитов и/или корд-фактора – *Moraxella catarrhalis*; *Burkholderia cepacia*; *Pseudomonas aeruginosa*; без жгутиков, с полярными депозитами и/или корд-фактором (*Corinebacterium diphtheriae*).

Царство грибов. При визуализации грибов методом СЭМ+ЛК по морфологическим признакам выделено 2 типа: дрожжи (и дрожжеподобные) и гифальные. Это деление основано на том, из каких клеток состоит тело гриба (мицелий). Мицелий может состоять из тонких ветвящихся нитей, как у гифальных грибов. У дрожжеподобных грибов мицелий состоит из клетки, однако они могут образовывать псевдогифы и псевдомицелий, состоящий из цепочки удлиненных клеток.

Простейшие. Используя метод СЭМ+ЛК, оценивали фенотипические характеристики клеток простейших. 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).

Влияние индивидуального температурного профиля глазной поверхности на культивирование микроорганизмов

В исследуемых группах (1а, 2б) был проведен совокупный анализ температурного оптимума роста ассоциированных с ГП колоний и данных термографии ГП.

Было выявлено, что в подгруппе 1а условной нормы признаки психротолерантности у выделенных с поверхности роговицы микроорганизмов либо отсутствовали, либо являлись слабо выраженными.

Микроорганизмы, выделенные с ГП подгруппы с инфекционным кератитом с “холодным” пораженным глазом, проявляли признаки облигатной психротолерантности.

У всех микроорганизмов, выделенных с ГП подгруппы с инфекционным кератитом с “теплым” пораженным глазом, несмотря на повышение температуры пораженного глаза относительно нормы, наблюдали признаки холодовой устойчивости, а именно – факультативной психротолерантности. При этом в подгруппе с гипертермией ГП были выявлены как микроорганизмы со слабо выраженной факультативной психротолерантностью, так и явно выраженной.

Одним из основных результатов настоящего исследования можно считать обнаружение устойчивого сигнала облигатной психротолерантности при культивировании микроорганизмов, выделенных у пациентов с гипотермией ГП. Бактериологические методы исследования не позволили бы обнаружить такие микроорганизмы, поскольку стандартная температура культивирования 37 °С.

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.

При ретроспективном анализе амбулаторных карт пациентов с инфекционным кератитом было выявлено то, что у пяти из семи пациентов, объединенных нами в обсуждении в группу с выявленным состоянием тепловой дисрегуляции ГП, были признаки, потенциально указывающие на нейротрофические нарушения.

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 будут 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.

Результаты культурального исследования «здоровой» глазной поверхности

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

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 наблюдали 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 определяли большее количество фенотипически отличающихся микроорганизмов, чем было выделено культуральным методом исследования, а именно помимо коккоморфных микроорганизмов выявлены палочковидные микроорганизмы. В двух случаях несоответствия посев был отрицательным, а методом СЭМ+ЛК визуализировали коккоморфные микроорганизмы.

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 выделили несколько видов грамположительных коккоморфных микроорганизмов. Среди коккоморфных микроорганизмов 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 идентифицированы несколько видов микроорганизмов, которые отличались по морфологическим признакам, окраске по Граму и типовой принадлежности.

Смешанная флора была выделена у двух участников исследования.

Роста микроорганизмов не наблюдалось – у 5 участников исследования.

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 наблюдали 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. При этом в двух случаях частичного соответствия методом СЭМ+ЛК визуализировалось большее микробиологическое разнообразие, чем было получено культуральным методом исследования. В трех случаях несоответствия посев был отрицательным, а методом СЭМ+ЛК в одном случае были обнаружены клетки дрожжеподобных грибов, палочковидные и коккоморфные микроорганизмы, в двух случаях только клетки дрожжеподобных грибов.

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

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 установлены в 37

случаях, клетки грибов в 6 пробах, причем в 5 пробах помимо грибоподобных клеток были также обнаружены бактериальные клетки (Рисунок 1). В семнадцати пробах — 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 обнаружены на ГП с большей частотой как в качестве одного визуализированного микроорганизма, так и в случае визуализации смешанной флоры.



Рисунок 1 – Диаграмма распределения микроорганизмов, визуализированных методом СЭМ в образцах «здоровой» ГП

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

По результатам визуализации образцов подгруппы 3б 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 – бактериальные и грибоподобные клетки (Рисунок 2). 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 установлены объекты, которые можно было бы идентифицировать в качестве микробильного окружения, однако визуализированы летки полиморфноядерных лейкоцитов, эритроцитов и клетки роговичного эпителия.



Рисунок 2 – Диаграмма распределения микроорганизмов, визуализированных методом СЭМ в образцах с ГП при кератите

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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Визуализация нормальной микрофлоры глазной поверхности посредством импрессионной пробы с использованием сканирующего электронного микроскопа и лантаноидного контрастирования / М. В. Кравчик, Е. С. Родина, А. М. Суббот, О.И. Пимонова, Е.И. Фетцер, И.А. Новиков // **Вестник офтальмологии.** – 2022. – Т. 138, № 6. – С. 5-13.

2. Новиков И.А., Кравчик М.В., Пак О.А., Каспарова Е.А., Ярцев В.Д., Родина Е.С., Солодовников В.И., Суббот А.М. Сканирующая электронная микроскопия с суправитальным контрастированием в экспресс-диагностике заболеваний глаза и придаточного аппарата // **Вестник офтальмологии.** – 2023. -139(3-2) – С.136-144.

3. 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.

4. Изучение температурных условий роста микроорганизмов глазной поверхности в норме и при инфекционных кератитах / С.Э. Аветисов, Е.С. Родина, М.В. Кравчик, Д.В. Косова, Е.И. Фетцер, И.А. Новиков // **Вестник офтальмологии.** – 2024. – Т.140, №3. – С. 34-42.

5. Родина Е.С. Методы оценки микробиологического разнообразия глазной поверхности / Е. С. Родина, Е. И. Фетцер, И. А. Новиков // **Вестник офтальмологии.** – 2024. – 140, №3, С.96 -108.

6. Создание атласа эталонных культур для оценки микробиологического статуса глазной поверхности методом сканирующей электронной микроскопии с лантаноидным контрастированием/ Родина Е.С., Чеботарь И.В., Кравчик М.В., Лямин А.В., Фетцер Е.И., Зайцев А.В., Новиков И.А. // **Современные технологии в офтальмологии** – 2022 - №3 – С.241-247

7. Родина Е.С. Изменчивость микробиоты глазной поверхности при нейротрофическом кератите // **Материалы научно-практической конференции аспирантов и молодых ученых кафедры глазных болезней ФГАОУ ВО «Первый**

МГМУ им. И.М. Сеченова» «Избранные вопросы офтальмологии» (Москва, 17 июня 2022 г.). –Москва, 2022. – С.33-40.

Список примененных 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