

Министерство образования и науки Российской Федерации

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧЕРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра динамического моделирования и  
биомедицинской инженерии  
наименование кафедры

**ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА СПЕКЛ-МИКРОСКОПИИ  
ДЛЯ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ ХЛАМИДИЙ**

**АВТОРЕФЕРАТ ВЫПУСКНОЙ КВАЛИФИКАЦИОННОЙ  
(МАГИСТЕРСКОЙ) РАБОТЫ**


студентки 2 курса 206 группы

направления 12.04.04 Биотехнические системы и технологии  
код и наименование направления

факультета nano- и биомедицинских технологий  
наименование факультета

Калдузовой Ирины Александровны  
фамилия, имя, отчество

Научный руководитель  
профессор, д.ф.-м.-н  
должность, уч. степень, уч. звание

 5.06.18.  
подпись, дата

С.С. Ульянов  
инициалы, фамилия

Зав. кафедрой  
д.ф.-м.-н, доцент  
должность, уч. степень, уч. звание

  
подпись, дата

Е.П. Селезнев  
инициалы, фамилия

Саратов 2018 г.

*Введение.* Спектральные методы исследования являются мощным средством дистанционного контроля параметров различных сред. Особое значение они приобретают для многократно рассеивающих сред, в которых протекают различные реакции, приводящие к изменению оптических параметров. Применение методов лазерной спектроскопии позволяет повысить чувствительность, проводить количественный и качественный анализ сред.

Хламидиоз — инфекционное заболевание, передающееся половым путём, вызываемое хламидиями (*Chlamydia trachomatis*). Так как хламидии не относятся ни к вирусам, ни к бактериям их достаточно сложно обнаружить. Современные методы диагностики этой инфекции, зачастую либо слишком дорогие и сложные, либо мало эффективные.

Поэтому для упрощения диагностики и повышения эффективности важное практическое значение имеет разработка новых методов детектирования хламидий. Для решения этой проблемы предлагаем следующий метод детектирования данной инфекции, а именно: детектирования хламидий методом спекл-микроскопии.

Актуальность темы: ежегодно, по статистике, хламидиозом в мире болеет 75 млн человек, а число инфицированных хламидиями людей на всем земном шаре по самым скромным подсчётам достигает 1 миллиарда. Хламидиоз - одно из самых распространённых заболеваний, о чем свидетельствуют данные ВОЗ, а также отчеты многочисленных отечественных и зарубежных исследовательских кампаний. Именно поэтому серьёзную проблему для современной науки представляет поиск максимально эффективных способов обнаружения этой инфекции.

Учитывая широкую распространенность данного заболевания, а также специфичность самой хламидии и способов ее обнаружения, разработка новых методов детектирования становится всё более актуальной.

### Цели и задачи работы

Цель исследования - разработать новый метод детектирования хламидий с использованием спекл-микроскопа, показать практическую значимость нового метода.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Провести литературный обзор:
  - по современным методикам детектирования хламидий
  - по методам спекл-микроскопии
2. Разработать устройство для детектирования бактерий типа *Chlamydia trachomatis*
3. Провести ряд экспериментов для получения практических результатов

Научная новизна: обусловлена разработкой совершенно нового подхода к детектированию бактерий типа *Chlamydia trachomatis*, с целью упрощения диагностики, а также для увеличения эффективности и повышения качества результатов.

Структура и объем работы: по своей структуре работа состоит из введения, 3 глав, заключения и библиографического списка используемых источников. Работа изложена на 45 странице машинописного текста, содержит 13 рисунков, 2 таблицы и списка литературы из 59 наименований.

### Основное содержание работы

Во *введении* обосновывается актуальность выбранной темы и решаемых задач, формулируется цель исследования, определяется научная новизна и практическая ценность результатов.

*В первой главе* дается теоретическое обоснование выбора темы для магистерской диссертации. Указываются основные понятия, необходимые для выполнения практической части, а также проводится литературный обзор по современным методикам оптического детектирования биологических объектов.

*Во второй главе* описываются биологические свойства, а также дается полная классификация хламидий. Показаны основные циклы развития хламидий. Представлены современные способы диагностики этой инфекции. Подробно описаны достоинства и недостатки каждого метода.

#### **Методы прямого выявления:**

*Культуральная диагностика.* Выделение культуры клеток возбудителя на среде McCoу или HeLa.

**Достоинства:** высокая чувствительность и специфичность (для диагностики достаточно обнаружения одной клетки с цитоплазматическими включениями).

#### **Недостатки и ограничения:**

- Высокая стоимость
- Метод требует специализированного оснащения и соответствующей квалификации персонала.
- Условием получения достоверного результата является полное освобождение материала от сопутствующей бактериальной флоры, предупреждение гибели хламидий при транспортировке, прекращение приема антибиотиков за месяц до исследования.
- Высокая стоимость, длительность и трудоемкость метода.

Методы ДНК диагностики. Обладают высокой чувствительностью и специфичностью. Требуют взятия материала для анализа непосредственно из очага локализации возбудителя.

*Метод прямой иммунофлюоресценции (ПИФ).* ПИФ - это прямое выявление антигенов хламидий. При люминесцентной микроскопии хламидийные включения определяются в виде образований в клетке эпителия с зеленой или желто-зеленой флюоресценцией на коричнево-оранжевом фоне цитоплазмы клеток.

Положительный контроль должен иметь не менее 10 элементарных телец, расположенных внеклеточно и имеющих характерную флюоресценцию.

**Достоинства метода:**

- Высокая чувствительность и специфичность (до 98%).
- Быстрое выявление хламидий.
- Возможность определения возбудителя в небольшом количестве материала.

**Недостатки и ограничения:**

- Метод требует специального оснащения и соответствующей квалификации персонала.
- Могут возникнуть трудности при взятии материала.
- Субъективность оценки результатов.
- Низкая чувствительность при малом количестве антигенов хламидий. В настоящее время применяется редко.

### **Методы непрямого выявления:**

*Иммуноферментный анализ (ИФА).* В основе этого метода лежит реакция связывания антител со специфическими полисахаридами или белками возбудителями (антигенами). Количественная оценка связывания антител с антигеном возбудителя проводится по степени выраженности цветной реакции. Время выполнения теста около 5 часов.

### **Преимущества метода:**

- Возможность определения не только самих микроорганизмов, но и их растворимых антигенов, которые накапливаются в жидкостях инфицированного организма.
- Автоматизация и высокая пропускная способность.

### **Недостатки и ограничения:**

- Невысокая точность результатов около 50-60%.

*Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР).* Также широко используемая методика, точность которой достигает 90-95%. По целому ряду причин метод настоятельно рекомендуется комбинировать с ИФА. Это метод прямого определения специфической последовательности родительской ДНК для копирования (амплификации) с помощью двух коротких фрагментов ДНК (праймеров), которые комплементарны концевым участкам этой последовательности. Затем происходит удлинение последовательности ДНК за счет имеющихся в реакционной смеси в избытке дезоксинуклеозидтрифосфатов. В результате этого процесса происходит образование ампликонов копии обнаруженной последовательности ДНК. Ампликоны выявляют посредством электрофореза в агарозе. Наличие

специфического фрагмента ДНК определяют с помощью контрольной ДНК исследуемого возбудителя, амплифицированной одновременно с клиническими образцами.

**Достоинства метода:**

- Уникальная видовая специфичность и чувствительность (до 10 молекул ДНК).

**Недостатки и ограничения:**

- Высокая стоимость.
- Метод требует специального оснащения и соответствующей квалификации персонала.
- Большой риск загрязнения образцов продуктами амплификации при несоблюдении протокола исследования

Использование методов связано с достаточно трудной их воспроизводимостью. Методологические нарушения в сочетании с ложноположительными реакциями диагностикумов некоторых производителей, по некоторым данным, обуславливают до 30% случаев гипердиагностики заболевания. Что делает назначенное лечение не обоснованным.

*В третьей главе* представлены результаты, полученные в ходе проведения экспериментов.

Так как хламидии не относятся ни к вирусам, ни к бактериям их достаточно сложно обнаружить. Современные методы диагностики этой инфекции, зачастую либо слишком дорогие и сложные, либо мало эффективные. Поэтому для упрощения диагностики, а также в целях повышения эффективности был предложен следующий метод

детектирования хламидиальной инфекции, а именно: детектирования хламидий методом спекл-микроскопии.

В ходе выполнения магистерской диссертации, была разработана установка особого образца.

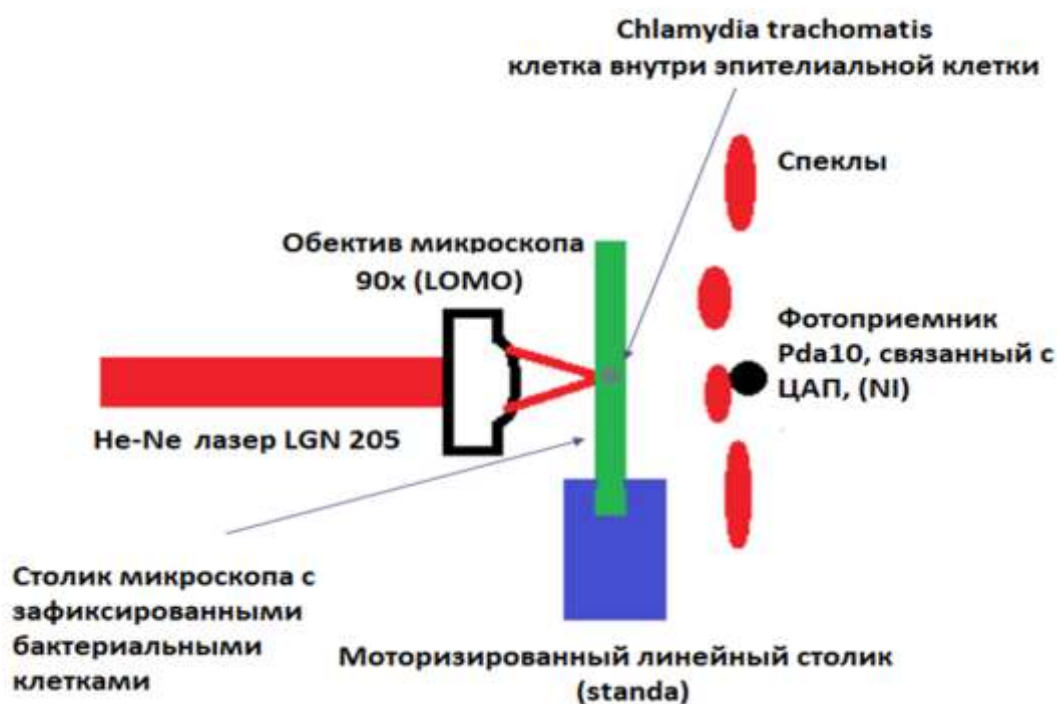


Рисунок 1 Оптическая схема спекл-микроскопа

Пучок полупроводникового лазера KLM (Кантегир, Россия) мощностью 5 мВт и длиной волны 650 нм фокусируется в малое пятно на анализируемом объекте с помощью микрообъектива с увеличением 90х и числовой апертурой  $NA=1.25$  (ЛОМО, Россия). Биологический образец закреплен на моторизованном столике (Standa, Литва). Спекл-флуктуации регистрируются фотоприемником PDA-10 (Thorlabs, США), подключенным к карте сбора данных (National Instruments, США).

Примеры образцов для сканирования показаны на рисунках 2 и 3:





Рисунок 2. Пример трех образцов инкубированными клетками McCoу: (1) Образец, промаркированный как контроль, (2) два часа инкубации, (3) 48 часов инкубации



Рисунок 3. чистые клетки McCoу (2.1): без красителя; образец, промаркированный как (2.2): окрашен по Романовскому-Гимзе.

Образцы клеток помещаются на предметное стекло, после чего фиксируются на моторизированном линейном столике. На образец направляется пучок лазерного света с 90х увеличением. Столик приводится в движение, а результат фиксируется на фотоприемнике, откуда сигнал передается на плату NI ELVIS.

Примеры выходных сигналов представлены на рисунках 4 и 5. Собственный шум детектора (PDA 10, Thorlabs, USA) показан на рисунке 4. Сигнал флуктуаций интенсивности динамических биоспеклов показана на рисунке 5. Практически никаких статистических различий между этими сигналами не наблюдается. Спектры этих сигналов показаны на рисунке 6, они выглядят как спектр белого шума. Это означает, что Броуновское движение бактерий слишком медленное. Доплеровский спектр содержит

только низкочастотную составляющую и флуктуации крайне медленного сигнала в течение интервала измерений не наблюдаются.

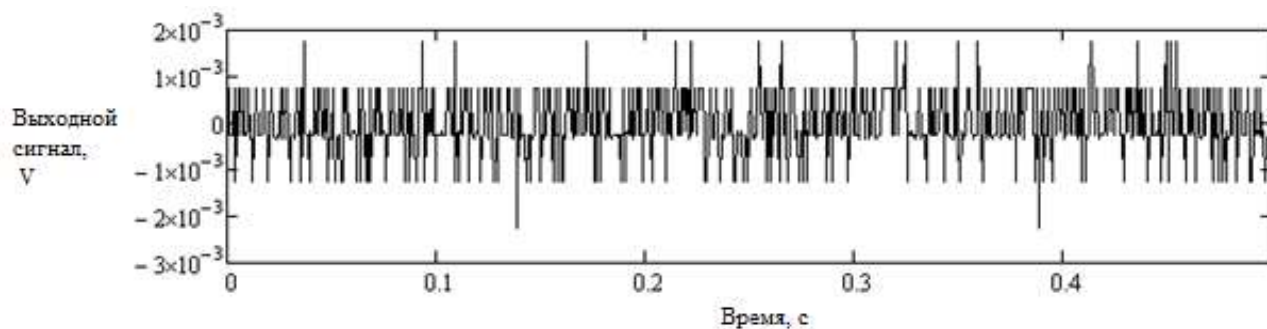


Рис. 4. Выходной сигнал фотоприемника. Собственный шум детектора без бактериального образца

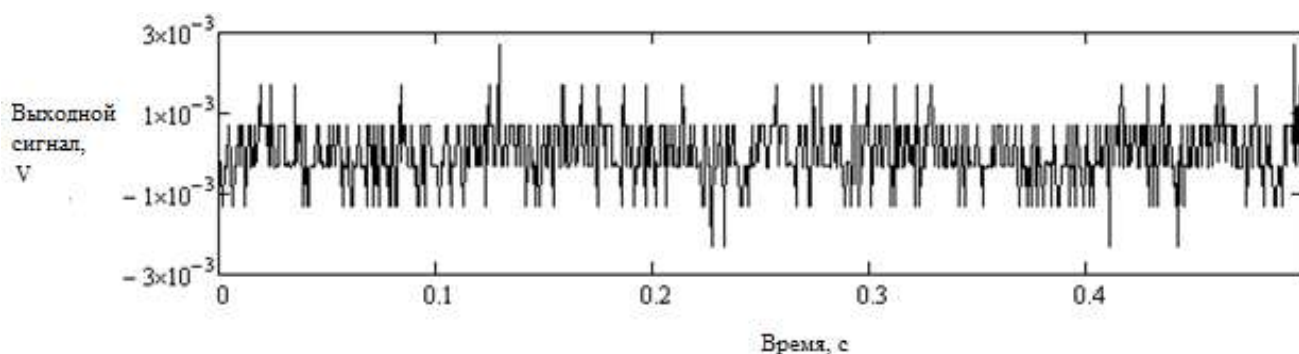


Рис. 5. Выходной сигнал фотоприемника. Нерастворенный раствор бактерий *chlamydia trachomatis*

Учитывая, что сигнал от неподвижного образца бактерий не обнаруживается и Броуновское движение бактерий *chlamydia trachomatis* не наблюдается, целесообразно ввести дополнительное сканирование образца.

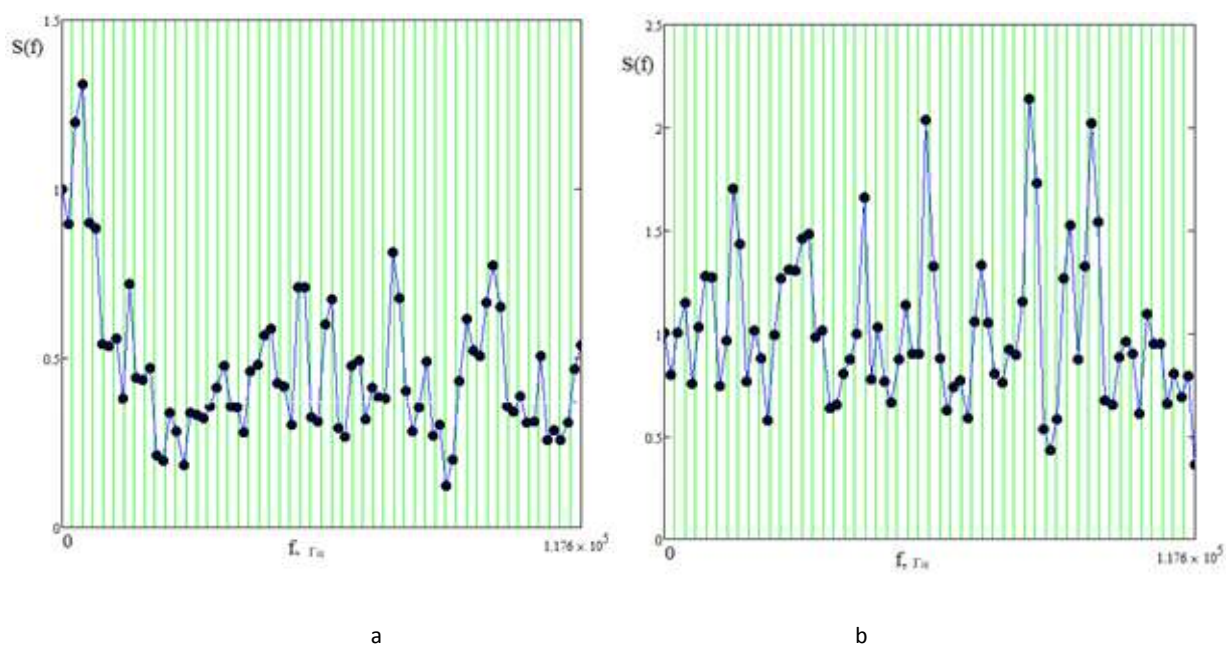
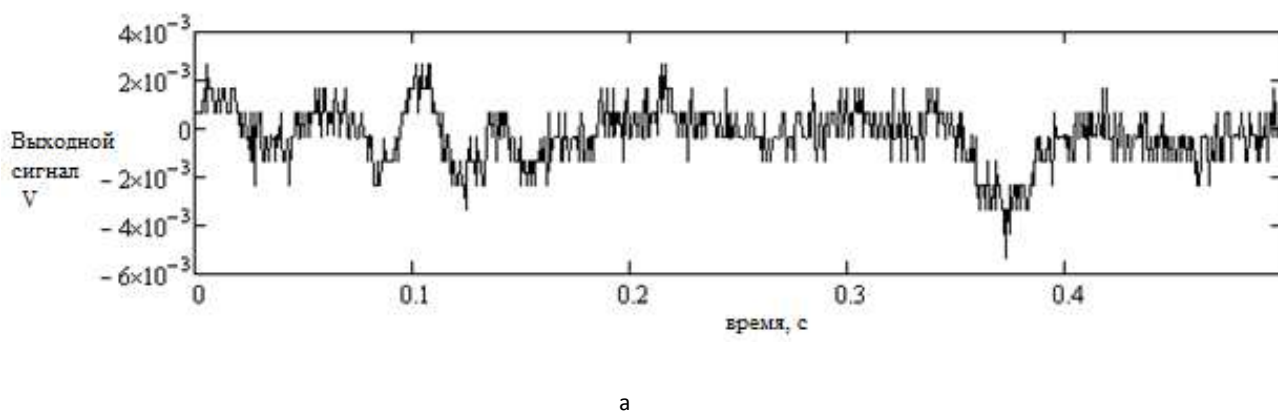
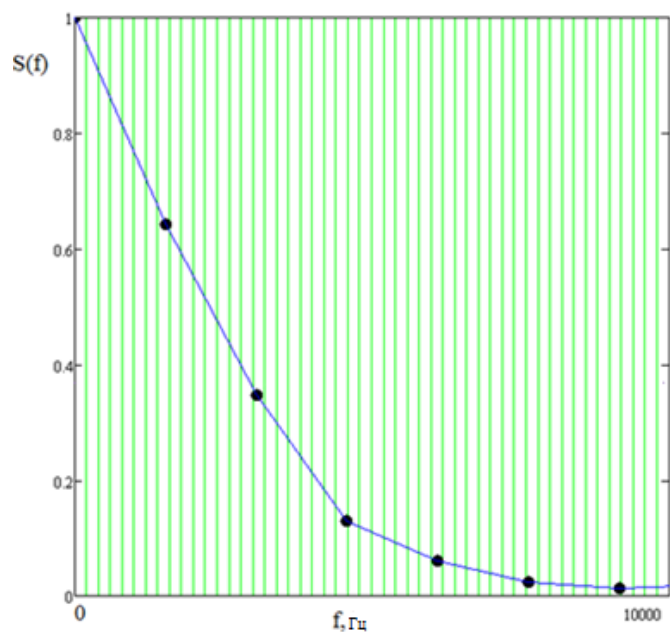


Рис.6. Спектр выходного сигнала фотоприемного устройства (а) спектр собственного шума детектора, (б) неподвижный образец, содержащий раствор *chlamydia trachomatis*

Выходной сигнал измерительной системы и ее спектр показаны на рисунке 7. Скорость сканирования составила 1 мм/с.





В

Рис. 7. Сканирование микрообъема с бактериальной суспензией. Выходной сигнал (а) и его спектр (б).

Очевидно, что теперь сигнал четко обнаруживается.

Хотя нет никаких проблем с получением сигнала от бактерий *S. trachomatis*, такой сигнал не так просто правильно интерпретировать. Если концентрация клеток *S. trachomatis* в суспензии низкая, а толщина слоя, содержащего клетки, составляет около 100 мкм, то такой образец можно рассматривать как поверхностно-подобный диффузор. Если концентрация клеток *S. trachomatis* высокая, но толщина слоя, содержащего эти клетки мала, что такая биопроба представляет собой рассеивающую среду с небольшим количеством рассеивателей. В этом случае теория диффузионной волновой спектроскопии (ДВС) с помощью НКР может быть применена для исследования высококонцентрированной водной суспензии клеток *S. trachomatis*.

Однако, промежуточная ситуация умеренной концентрации бактериальных клеток в суспензии, также возможна. При этом ни

традиционная теория сканирующей спекл-микроскопии, ни теория ДВС не применимы для интерпретации выходного сигнала спекл-микроскопа.

Перспективный подход, который может быть использован для анализа выходного сигнала спекл-микроскопа, основан на теории формирования спекл-спекл. Впервые эта теория была разработана для анализа процессов рассеяния в мелких кровеносных сосудах.

Упомянутая теория была адаптирована к задаче обнаружения *C. trachomatis* -клеток и экспериментально подтверждена в настоящей работе.

В ходе экспериментов был обнаружен надежный и повторяющийся отклик от клеток, зараженных *C. trachomatis*, при сканировании с использованием сфокусированного лазерного луча. Однако полученные результаты носят предварительный характер. На данный момент не совсем ясно, являются ли другие неоднородности McCoу или эпителиальной клетки способными производить ложные пики, которые аналогичны реакции сканирования клеток, зараженными хламидийными бактериями.

Потенциально предложенная методика может быть использована для быстрого 2D сканирования клинических образцов и автоматического обнаружения и распознавания клеток *C. trachomatis*.

Публикации автора по теме диссертации:

1. Ulyanov, S., Larionova, O., Ulianova, O., Zaitsev, S., Saltykov, Yu., Polyanina, T., Lyapina, A., Filonova, N., Subbotina, I., Kalduzova, I., Utz, S., Moiseeva, Yu., Feodorova, V. "Application of laser scanning speckle-microscopy for high-resolution express diagnostics of chlamydial infection," Proc. SPIE SFM100 – 79(3), 2018.
2. Ulyanov, S., Ulianova, O., Filonova, N., Subbotina, I., Moiseeva, Yu., Zaitsev, S., Saltykov, Yu., Polyanina, T., Lyapina, A., Kalduzova, I., Larionova, O., Utz, S., Feodorova, V., "Detection of the presence of Chlamydia trachomatis bacteria using diffusing wave spectroscopy with a small number of scatterers," Proc. SPIE SFM100– 62(3), 2018.
3. Ulyanov, S., Filonova, N., Ulianova, O., Utz, S., Moiseeva, Yu., Subbotina, I., Kalduzova, I., Larionova, O., Feodorova, V., "Using of dynamic speckled speckles with a small number of scatterers for study of suspension of Chlamydia," Proc. SPIE SFM100– 126(2), 2018.