

<https://doi.org/10.17116/rosstomat201710412-18>

Идентификация микроорганизмов на основе эффекта гигантского рамановского рассеивания

Д.м.н., проф. М.Т. АЛЕКСАНДРОВ, к.м.н. Э.Г. МАРГАРЯН*

ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Россия

Современные методы экспресс-диагностики заболеваний и процессов микробной природы основываются преимущественно на классических схемах микробиологического анализа. Многоэтапность этих анализов обуславливает их длительность, практически исключает экспрессность диагностики и не удовлетворяет требованиям эпидемиологической и клинической практики «по месту лечения». Поэтому разработка, внедрение и применение в клинической практике цифровых экспресс-методов лазерно-флуоресцентной диагностики открывает возможность для быстрой индикации микробов, определение их видовой специфичности и адекватного определения чувствительности к антимикробным препаратам, что позволит повысить эффективность и качество проводимого стоматологического лечения в клинической практике.

Ключевые слова: ЛКД-лазерная конверсионная диагностика (люминесцентная и/или раман-люминесцентная составляющие), антибиотикорезистентность, клиническая микробиология, индикация микробов, SERS-подложки, библиотека люминесцентных и/или рамановских спектров, рамановские пики, аппаратно-программный комплекс.

Identification of microorganisms based on the effect of giant Raman scattering

M.T. ALEKSANDROV, E.G. MARGARYAN

First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov, Moscow, Russia

Modern methods of diseases and microbiological processes express-diagnostic are principally based on classical microbiological analyzes. These analyzes require many stages what causes their prolongation, practically excepts an express diagnosis and does not meet the epidemiological and clinical practice «at the place of treatment». Therefore development, inclusion and application of the laser fluorescence diagnostic express-methods in clinical practice gives an opportunity for quick germs indication, determination of their species specificity and sensitivity to antimicrobial medications. It will improve quality and efficiency of the dental treatment in clinical practice.

Keywords: LCD-Laser conversion diagnostics (luminescent and Raman-luminescent constituents), antibiotic-resistance, clinical microbiology, microorganism indication, SERS-substrates, raman-spectrum library, raman peaks.

Методы экспресс-диагностики заболеваний и процессов микробной природы до недавнего времени развивались преимущественно на основе классических схем микробиологического анализа: выделение в чистой культуре возбудителя и последующей его идентификации по биохимическим, тинкториальным, антигенным и другим специфическим свойствам. Многоэтапность этих анализов обуславливает их длительность, практически исключает экспрессность диагностики и не удовлетворяет требованиям эпидемиологической и клинической практики, диагностики (по месту лечения).

Поэтому разработка и внедрение в клиническую практику цифровых экспресс-методов лазерной раман-флуоресцентной диагностики, позволяющих

получать результаты исследования в максимально короткие сроки (минуты, часы), возможности проведения и завершения анализа без выделения искомого организма в чистой культуре, использования только нативного материала и/или привлечения элективных биосред для быстрого накопления возбудителей, высокой чувствительности и специфичности, производительности метода, его простоты, доступности и воспроизводимости анализов крайне необходима [3, 4].

При этом существующие лабораторные технологии ЛФД (лазерная флуоресцентная диагностика) не позволяют проводить видовую идентификацию микробов (ЛЭСА, Спектролюкс, Флюол) и не обладают достаточной аналитической чувствитель-



Рис. 1. Внешний вид АПК ИнСпектр различного назначения(с насадками и со световодом).

ностью (10^8 — 10^{11} КОЕ/мл, что не соответствует инициальным стадиям развития воспалительного процесса, объективной оценке эффективности его лечения и реабилитации) и специфичностью, относительно длительны (часы, сутки) и трудоемки [5].

В связи с этим основной целью нашего исследования было повышение эффективности ЛКД микробов на основе эффекта гигантского рамановского рассеивания и флюоресценции и цифровых технологий на их основе с высокой аналитической чувствительностью (10^4 — 10^5 КОЕ/мл) адекватной начальным стадиям воспалительного процесса и его реабилитации.

Задачи исследования

1. Разработать блок-схему АПК, алгоритм его программного продукта и экспресс-методику индикации микробов на основе эффекта гигантского рамановского рассеивания и флюоресценции.

2. Оценить аналитическую чувствительность разработанной методики.

3. Провести сравнительную характеристику рамановских спектров различных клинических штаммов, микробов и их изменение при действии на микроб антисептиков.

4. Оценить возможности и перспективы разработанной экспресс-методики индикации микробов в клинической стоматологии.

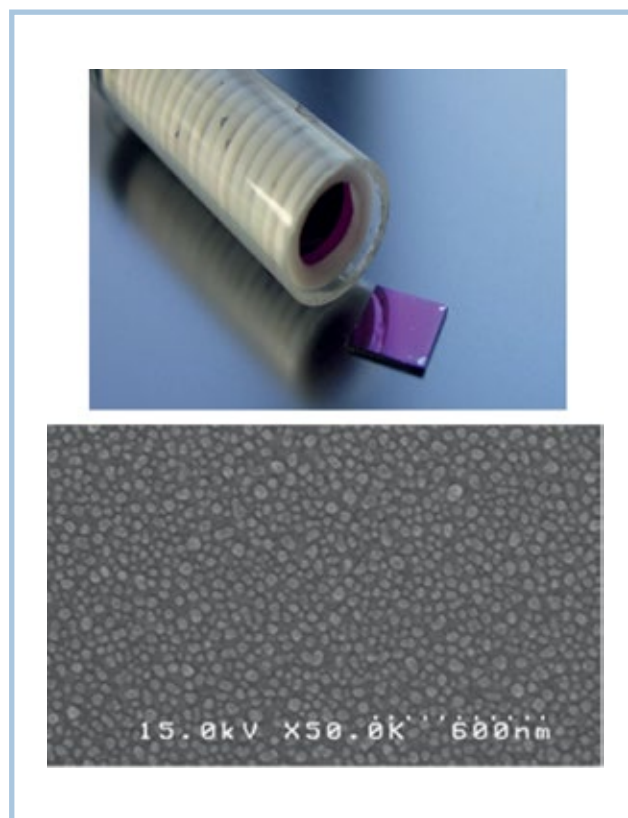


Рис. 2. Подложка с металлическими наночастицами серебра с электронного микроскопа.



Рис. 3. Структурная блок-схема раман-люминесцентного АПК комплекса ИнСпектр.

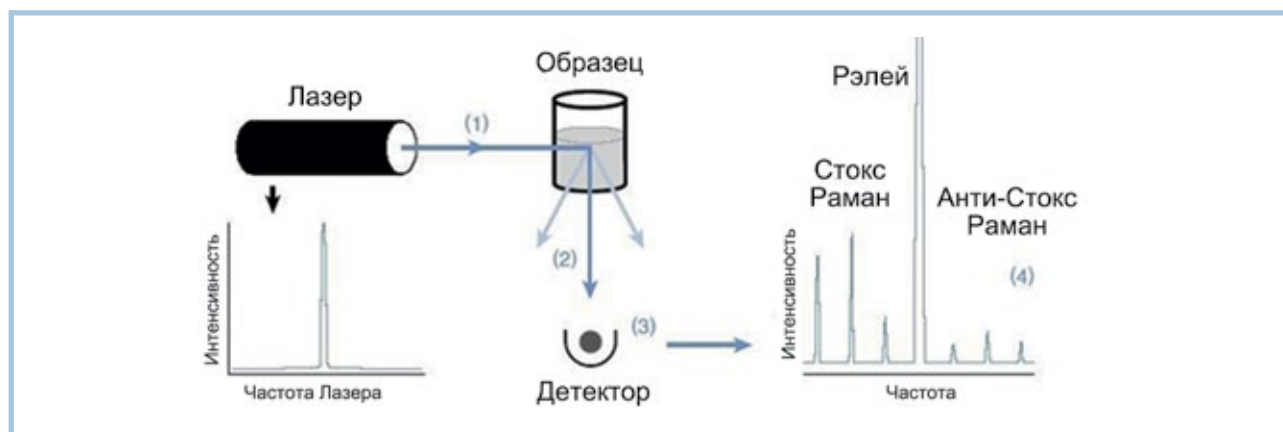


Рис. 4. Схема получения рамановского излучения.

1 — лазерный луч, возбуждающий образец; 2 — рассеивание луча во всех направлениях; 3 — частичное попадание света на детектор, который регистрирует раман-спектр; 4 — на спектре представлен свет на начальной частоте лазера (или рэлеевской) и спектральные особенности, характерные для каждого уникального образца.

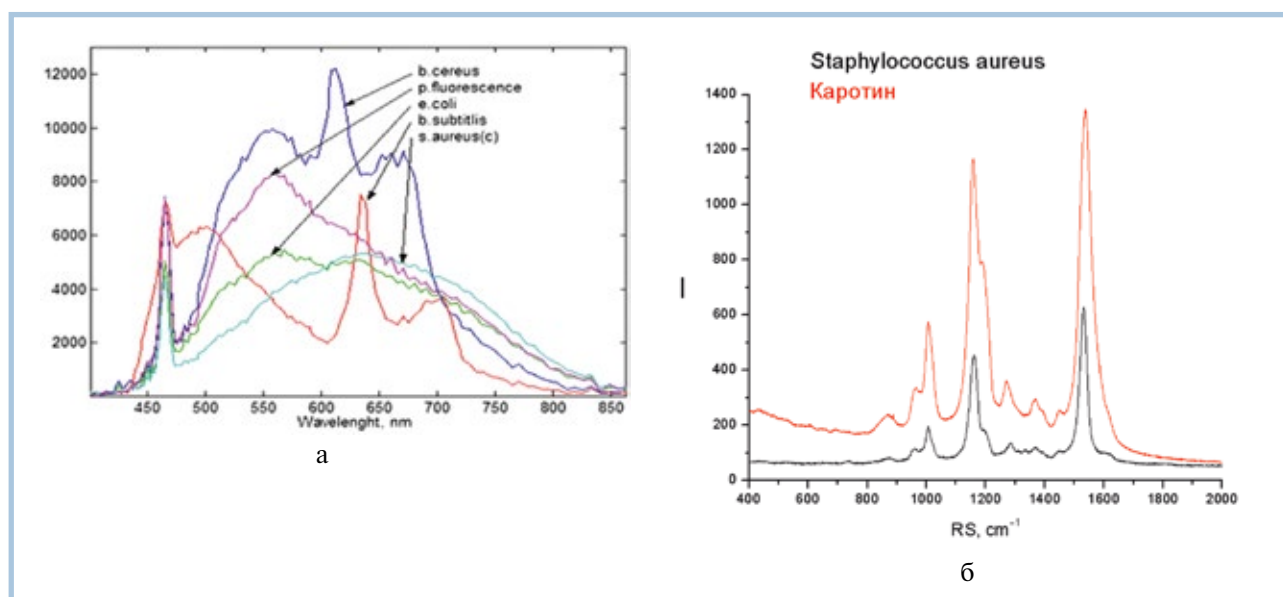


Рис. 5. а. Спектры флюоресценции микробов при концентрации одного порядка (10x8 КОЕ/мл); б — сравнительные рамановские спектры *S. aureus* и каротина.

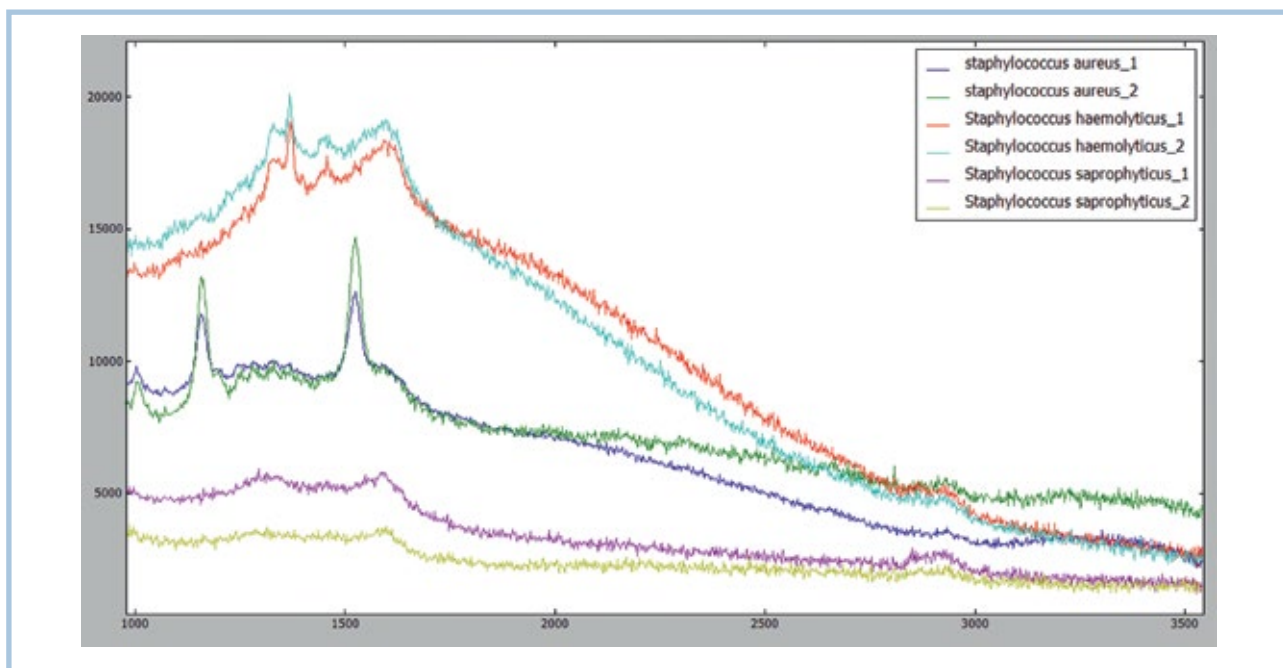


Рис. 6. Сравнение спектров различных клинических штаммов стафилококка.

Красный и голубой спектры — спектры *Staphylococcus haemolyticus* от разных больных. Синий и зеленый спектры — спектры *Staphylococcus aureus* от разных больных.

Фиолетовый и желтый спектры — спектры *Staphylococcus saprophyticus* от разных больных.

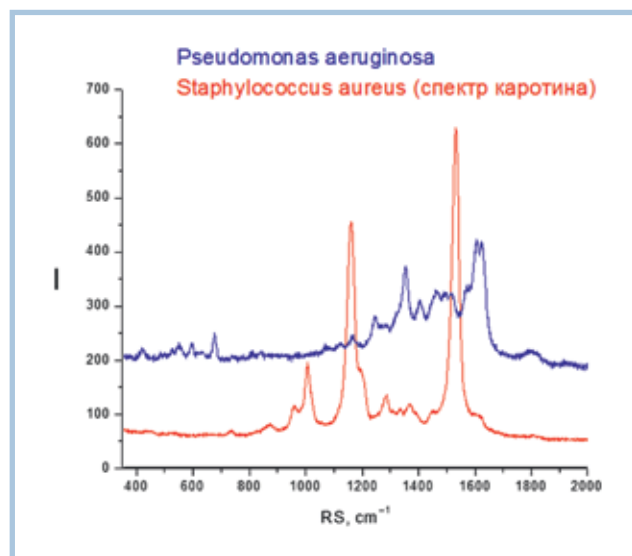


Рис. 7. Сравнение спектров *P. aeruginosa* и *S. aureus*.

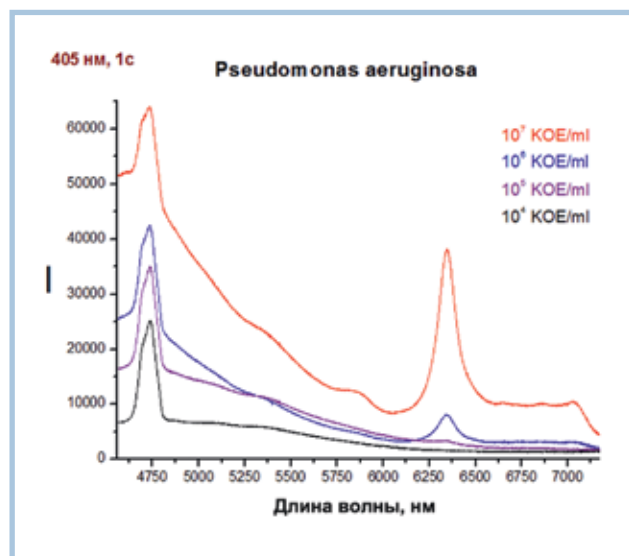


Рис. 8. Спектры люминесценции суспензий *Pseudomonas aeruginosa* при разных объемных концентрациях.

Материал и методы

Для исследования использовали суточные культуры *B. subtilis*, *Candida*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*. Культуры выращивали на простых (МПА, МПБ) питательных средах с помощью нефлюоресцирующей подложки (представляет собой мембранный микробиологический фильтр, состоящий из смеси нитрата и ацетата целлюлозы, размер пор 0,45 мкм). Последние использовали для повышения эффективности

индикации и выявления различий в спектрах микробов, исключения влияния флюоресцирующих пигментов питательной среды на результаты исследования спектров микробов.

Перед измерением спектров подложку с культурой помещали на предметное стекло и с помощью АПК ИнСпектр (рис. 1), регистрировали спектр ЛКД (рамановского рассеивания и флюоресценции), проводили его оцифровку, анализ и интерпретацию.

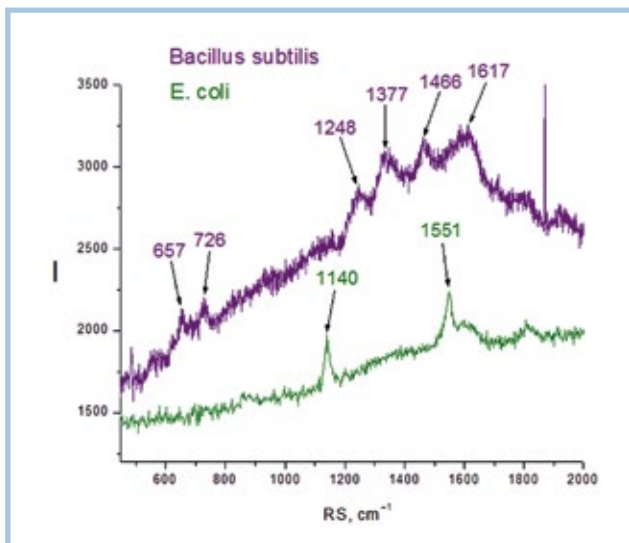


Рис. 9. Спектры *B. subtilis* и *E. coli*.

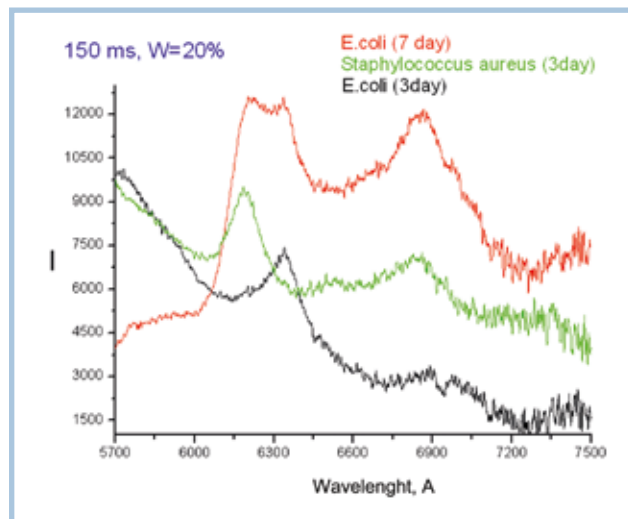


Рис. 11. Сравнение спектров люминесценции *E. coli* (7 сут), *S. aureus* (3 сут), *E. coli* (3 сут).

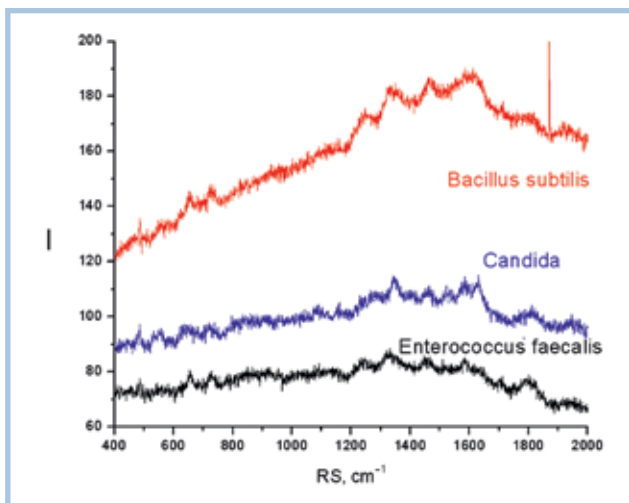


Рис. 10. Спектры *B. subtilis*, *Candida* и *E. faecalis*.

Аналогично проводили исследования спектров в виде мазков или взвеси микробов, помещенных на металлические наноструктурированные подложки (рис. 2), усиливающие интенсивность спектра, исследуемого объекта в 10×6 раз. Такой методологический подход соответствовал и задачам исследования.

Схематически раман-люминесцентный комплекс ИнСпектр изображен на рис. 3. Он включает лазер с лазерным фильтром (1); систему зеркал и линз (2); систему, собирающую сигнал, рассеянный исследуемым объектом и Edge-фильтр (3); спектрометр с CCD-камерой и контроллером, который обеспечивает обратную связь управлением лазером и запись сигнала рамановского рассеяния и люминесценции (4); персональный компьютер (5), на который устанавливается специализированное про-

граммное обеспечение с необходимой базой данных.

Результаты

1. Разработка методики лазерной конверсионной диагностики (рамановская, флюоресцентные составляющие) основывалась на следующей блок-схеме исследования (рис. 4).

2. Результаты исследования раман и/или раман-флюоресцентных спектров микробов представлены на рис. 5–12.

Из исследования видно, что спектры разных стафилококков различны, но одинаковы внутри одного вида.

На этих спектрах видны отличительные линии для каждой бактерии (фиолетовый спектр — *B. subtilis*, зеленый спектр — *E. coli*).

Для бактерии *B. subtilis* индивидуальные линии — 657 см^{-1} , 726 см^{-1} , 1248 см^{-1} , 1377 см^{-1} , 1466 см^{-1} , 1617 см^{-1} .

Для *E. coli* индивидуальные линии — 1140 см^{-1} , 1551 см^{-1} .

Метод раман-флюоресцентной диагностики также позволяет экспрессно выявлять низкие концентрации микробов по флюоресценции их порфиринов, выявляемых при использовании практически не флюоресцирующего детергента мирамистина (0,2% раствор) (см. рис. 13). Более того представленный биоотклик микробов отмечается только для их вегетативных форм (достоверно выраженное увеличение интенсивности раман-флюоресцентного сигнала) и отсутствует у убитых бактерий (например, кипячением). Такой методический прием в клинике позволит определять эффективность лечения ран (при гнойном воспалении), осуществлять адекватный выбор антимикробной терапии.

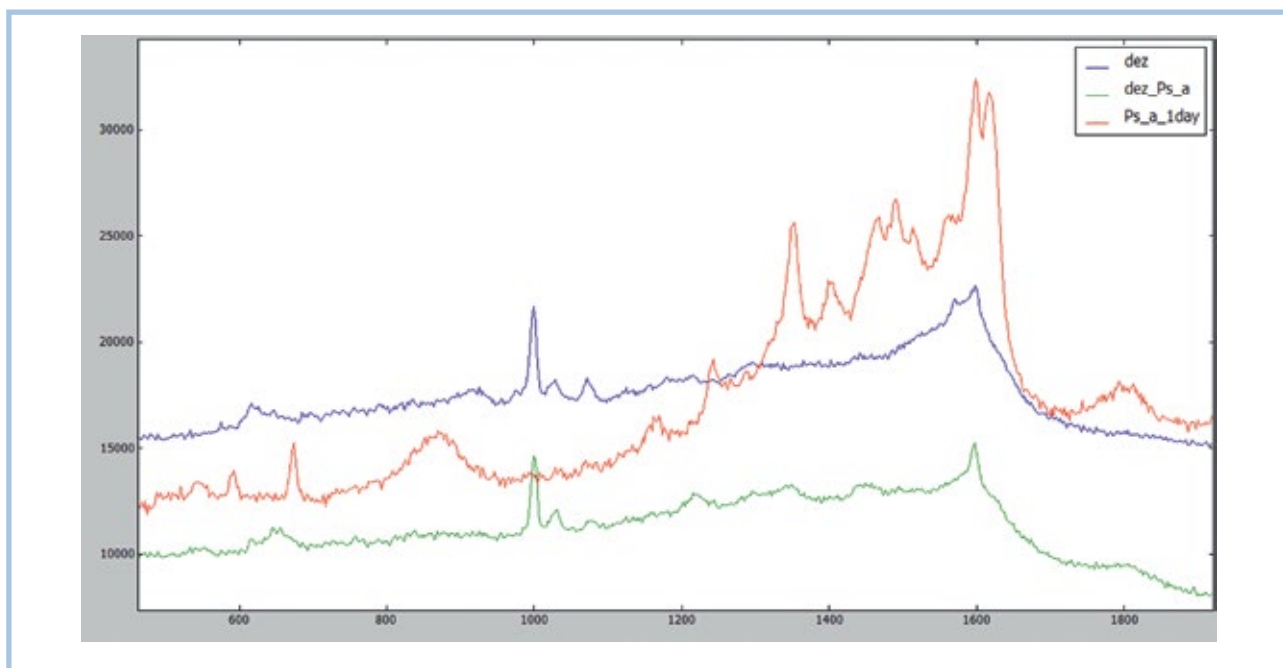


Рис. 12. Определение чувствительности микробов к антимикробным препаратам.

Из представленных результатов исследования следует, что исследования спектров микробов на подложке или без таковых практически не изменяет амплитудно-спектральной характеристики объекта исследования. Более того выявлены видовые различия в спектрах исследуемых структур за счет проявления их специфических рамановских спектров. Показано, что спектры ЛКД (рамановского рассеивания и флуоресценции) исследованных культур зависят от возраста культур. Спектры моментно изменяются, а их специфические рамановские линии сохраняются. Такая вариабельность свидетельствует о том, что видовая идентификация микробов проводится только при регистрировании рамановских спектров. При сравнительном изучении чувствительности и специфичности микробов методом ЛКД (ИнСпектр) показано (при повторении измерений по 100 раз для каждого вида микробов), что она составляет соответственно практически 100% в обоих случаях показано, что при этом аналитическая чувствительность достигала предела концентрации микробов — 150 КОЕ/м—10×4 КОЕ/мл. (что практически по аналитической чувствительности соответствует бактериологическому методу — 10×4—10×5 КОЕ/мл).

В отдельном эксперименте изучали возможность использования экспресс-ЛКД технологии для определения экспресс-чувствительности к антимикробным препаратам. Из рисунка следует, что при создании смеси хлорами́н—микроб (*P. aeruginosa*) в водной среде микроб (точнее его амплитудно-спектральные характеристики) распадается и его специ-

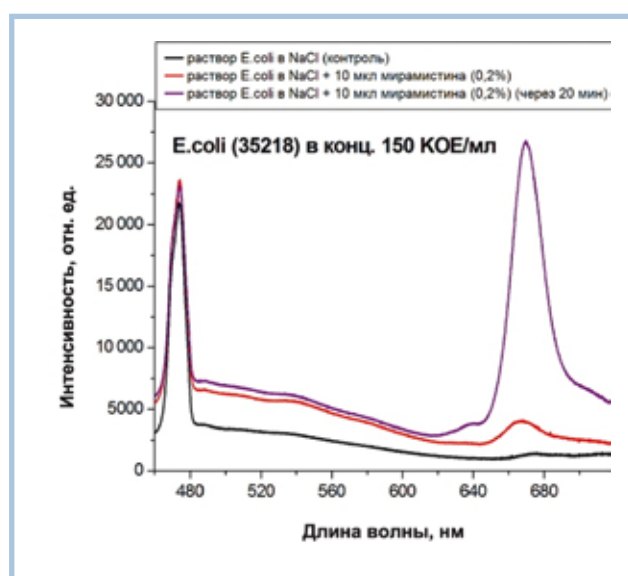


Рис. 13. Выявление низких концентрации *E. coli* (150 КОЕ/мл) по флуоресценции их порфиринов, после детергентного воздействия раствора мирамистина (проводили без использования SERS-подложек).

фические амплитудно-спектральные характеристики исчезают (объект разрушен и не идентифицируется) в отличие от контрольных объектов сравнения (хлорами́н—водный раствор). Время исследования составило 2—3 мин.

Таким образом, применение технологии ЛКД гигантского рамановского рассеивания и флуоресценции, как новой технологии открывает возмож-

ность ее для экспресс-индикации микробов, определение их видовой специфичности, чувствительности микробов к антимикробным препаратам и в других областях клинической микробиологии на основе принципиальных требований современной медицины «диагностика по месту лечения». Дальнейшее совершенствование программного продукта, базы данных и методик ЛКД в интересах боль-

ного и врача, качества и эффективности диагностики и лечения пациентов позволит внедрить ее в повседневную клиническую практику.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы в равной степени принимали участие в подготовке материала.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Александров М.Т. *Лазерная клиническая биофотометрия (теория, эксперимент, практика)*. М.: Изд-во Техносфера, 2008. — 584 с. [Alexandrov MT. *Laser Clinical Biophotometry (theory, experiment, practice)*. Moscow, Tekhosfera Publ., 2008;584. (In Russ.)].
2. Александров М.Т., Воробьев А.А., Зайцева Т.Л., Карасенков Я.Н., Родионов А.Д., Пашков Е.П., Филатов М.В. Лазерная флюоресцентная диагностика заболеваний полости рта. Научные труды 4-й Международной практической конференции «Здоровье и Образование в XXI веке» 23—25 мая 2003, г. Москва. [Alexandrov MT, Vorobyov AA, Zaytseva TL, Karasenkov YaN, Rodionov AD, Pashkov EP, Filatov MV. Laser fluorescent diagnosis of diseases of an oral cavity. Scientific works of the 4th International practical conference «Health and Education in the XXI Century» on May 23-25, 2003 Moscow. (In Russ.)].
3. Кукушкин В.И., Сатушева Е.В., Александров М.Т., Морозова О.А., Пашков Е.П., Амбарцумян О.А., Амосова В.А. Применение лазерных раман-люменесцентных технологий для оценки качества мясных продуктов и определения степени их бактериальной обсемененности. *Журнал микробиологии, эпидемиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. — 2015. — № 5. — С. 70-75. [Kukushkin VI, Satusheva EV, Aleksandrov MT, Morozova OA, Pashkov EP, Ambartsumyan OA, Amosova VA. Application laser the raman-lyumenescentnykh of technologies for an assessment of quality of meat products and definition of degree of their bacterial obsemenennost. *Zhurn microbiology, epidemiology, epidemiology and immunobiology*. 2015;5:70-75. (In Russ.)].
4. Александров М.Т., Буданова Е.В., Баграмова Г.Э., Пашков Е.П. Способ идентификации микроорганизмов с помощью эффекта гигантского рамановского рассеивания. *Международный научно-исследовательский журнал*. 2017;6-2(60):50-55. [Aleksandrov MT, Budanova EV, Bagramova GE, Pashkov EP. Method of microorganisms identification with the help of the effect of large raman diffusion. *International research journal*. 2017;6-2(60):50-55. (In Russ.)].
5. Метод флюоресцентной диагностики — метод индикации микрофлоры человека в норме и патологии». — *ЖМЭИ*. — 2001. — № 3. — С.57-60. [Method of fluorescent diagnostics — a method of indication of microflora the person in norm and pathology. *Zh JMEI*. 2001;3:57-60. (In Russ.)].

43-й Московский
международный
стоматологический
форум и выставка

DENTAL[®]
SALON

Дентал Салон

23-26 апреля 2018

г. Москва, Крокус Экспо
пав. 2, этаж 3, залы 9, 10, 11
Просзд: м. "Мякинино"

На правах рекламы, 6+



www.dental-expo.com

Устроитель:

DENTALEXPO[®]

Организаторы и
партнер



К.П. Лабанд - партнер выставки,
технический партнер

Septanest[®]

Спонсоры и
партнеры выставки

**Стоматология
GET DENT**

Спонсоры и
партнеры выставки

DENTAL TRIBUNE