

Д.В.Уткин, О.С.Кузнецов, П.С.Ерохин, А.Н.Спицын, О.А.Волох, Н.А.Осина

РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ИЗУЧЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»», Саратов

Одним из методов изучения поверхностной структуры клеток возбудителей особо опасных инфекционных болезней и проведения морфометрического анализа является атомно-силовая микроскопия. Атомно-силовая микроскопия по получаемым результатам приближена к сканирующей электронной микроскопии, однако позволяет избежать трудоемкие и длительные процедуры подготовки образцов к исследованию, связанные с фиксацией, обезвоживанием и напылением проводящего слоя. Нами был разработан методический подход подготовки и анализа образцов возбудителей особо опасных инфекционных болезней с использованием методов атомно-силовой микроскопии, включающий выбор оптимальной подложки, режима обеззараживания и сканирования образцов.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, особо опасные инфекционные болезни, морфометрический анализ.

D.V.Utkin, O.S.Kuznetsov, P.S.Erokhin, A.N.Spitsyn, O.A.Volokh, N.A.Osina

Development of Methodological Approaches for Examination of Particularly Dangerous Infectious Diseases Agents by Means of Atomic Power Microscopy

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

The atomic power microscopy (APM) is used to study the cell surface structure of particularly dangerous infectious diseases agents and to carry out the morphometric analysis. APM shows similar results with scanning electron microscopy. However, its application makes it possible to avoid time-consuming and labour-intensive procedures of samples preparing for testing by fixation, dehydration and sputtering of conducting layer. Methodological approach has been elaborated for preparing and analysis of samples of agents of particularly dangerous infectious diseases by means of APM. This approach includes a selection of optimal substrate, mode of disinfection and scanning of samples.

Key words: atomic power microscopy (APM), particularly dangerous infectious diseases, morphometric analysis.

Атомно-силовая микроскопия является одним из современных методов изучения морфологии и локальных свойств поверхности твердых тел с высоким пространственным разрешением [2]. В последние 10 лет атомно-силовая микроскопия стала применяться для исследования поверхностной структуры клеток про- и эукариот, клеточных фрагментов, вирусов и биологических макромолекул (белков, нуклеиновых кислот) [1, 6, 9, 10]. Преимущества атомно-силовой микроскопии перед электронной микроскопией связаны с возможностью проведения исследований нативных и фиксированных биологических препаратов как на воздухе, так и в жидкости, без применения дополнительных меток и красителей, без создания условий вакуума и напыления металлами. Кроме того, атомно-силовая микроскопия позволяет изучать локальные свойства поверхности биологических объектов, такие как жесткость, пластичность и адгезивность. Данные свойства атомно-силовой микроскопии открывают новые возможности изучения биологических молекул, клеток микроорганизмов, решения фундаментальных и прикладных задач в микробиологии возбудителей особо опасных инфекционных болезней.

В ряде случаев при исследовании клеток бактерий методом атомно-силовой микроскопии не требуются специальные методы подготовки образцов, т.к. атомно-силовая микроскопия позволяет изучать как живые клетки, так и высушенные на воздухе. Однако исследование возбудителей особо опасных инфекционных болезней требует соблюдения биологической

безопасности при работе с биологическими объектами и обеззараживания микроорганизмов в соответствии с СП 1.3.1285-03 [4]. Нами установлено, что табельные средства обеззараживания возбудителей особо опасных инфекционных болезней, такие как кипячение, обработка формалином, фиксация спиртом приводят к нарушению морфологии клеток и поверхности клеточной стенки. Поэтому они не пригодны для подготовки микроорганизмов для атомно-силовой микроскопии. Регламентированные средства фиксации возбудителей инфекционных болезней для атомно-силовой микроскопии отсутствуют.

Целью данной работы стала разработка методических подходов подготовки микроорганизмов I–II групп патогенности для исследования методом атомно-силовой микроскопии.

Материалы и методы

В работе использовали штаммы возбудителей особо опасных инфекционных болезней: *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae* полученные из «Государственной коллекции патогенных бактерий» ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» и лаборатории препаратов против чумы и других особо опасных инфекций ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича. Штаммы микроорганизмов выращивали на твердых питательных средах (агаре Хоттингера (pH 7,2) – штаммы *Y. pestis*,

B. anthracis, агаре Хоттингера (рН 7,6) – *V. cholerae*, FT-агаре (рН 7,2) – *F. tularensis*, эугоник агаре (рН 7,2) – *Brucella spp.*) в течение 48 ч при температуре 28 °С (*Y. pestis*), 37 °С (остальные виды бактерий). Агаровые культуры бактерий в концентрации, соответствующей 5 (для *V. cholerae*) и 10 ед. (остальные виды микроорганизмов) отраслевого стандартного образца мутности (ОСО 42-28-85П), обеззараживали 2,5 % раствором глутарового альдегида в 0,1 молярном какодилатном буфере рН (7,2–7,4) в течение 2 ч при температуре 4 °С – для неспорообразующих и 5 % раствором глутарового альдегида в 0,1 молярном какодилатном буфере (рН 7,2–7,4) в течение 3 ч при температуре 50 °С – для спорообразующих (*B. anthracis*). Контроль специфической стерильности препаратов осуществляли в соответствии с Инструкцией по контролю специфической стерильности экспериментальных препаратов, приготовленных из культур чумного и холерного микробов (Саратов, 1982). Клетки бактерий после обеззараживания осаждали центрифугированием при 6000 об./мин в течение 15–20 мин, осадок отмывали дважды стерильной дистиллированной водой и хранили при температуре 4 °С. Для проведения атомно-силовой микроскопии полученную взвесь клеток в объеме 4 мкл помещали на поверхность подложки и высушивали на воздухе.

Исследования клеток проводили с помощью сканирующего зондового микроскопа Solver P47-PRO (NT-MDT, Россия) методом полуконтактной атомно-силовой микроскопии в воздушной среде. При этом использовали полуконтактные кремниевые зонды серии NSG01 (NT-MDT, Россия) жесткостью 5,1 Н/м, с радиусом кривизны 10 нм и резонансной частотой 150 кГц. Обработку и анализ изображений проводили с использованием программы Image Analysis (NT-MDT, Россия).

Результаты и обсуждение

При выборе подложки для проведения атомно-силовой микроскопии оценивали размах высот поверхности и среднеквадратичную шероховатость в нанометрах (нм). Традиционно в качестве подложки

для атомно-силовой микроскопии используют слюду, пирографит и другие слоистые материалы. В работе была изучена возможность применения альтернативных подложек (покровное стекло, полистирол, нитроцеллюлозная мембрана) в качестве субстрата для микроскопии клеток микроорганизмов. Установлено, что покровное стекло по своим физическим характеристикам (среднеквадратичная шероховатость поверхности стекла составляет 3–9 нм) приближено к слюде (среднеквадратичная шероховатость слюды – 4–15 нм) и может быть использовано при проведении исследований клеток микроорганизмов.

В связи с тем, что данные по обеззараживанию проб возбудителей особо опасных инфекционных болезней для атомно-силовой микроскопии в литературе отсутствуют, для подготовки неспорообразующих микроорганизмов I–II групп патогенности нами был использован режим фиксации, описанный для других видов грамотригативных бактерий (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), включающий обработку 2,5 % раствором глутарового альдегида в течение 2–2,5 ч при температуре 4 °С [8, 10]. Для обеззараживания культур возбудителя сибирской язвы применили режим дезинфекции спор 5 % раствором глутарового альдегида, нагретого до температуры 50 °С [5]. Фиксацию проводили в течение 3 ч. Установлено, что данные режимы обработки клеток бактерий I–II групп патогенности приводят к полному обеззараживанию материала. Полученные результаты подтверждены комиссионными испытаниями. Отмечено, что фиксация возбудителей особо опасных инфекционных болезней глутаровым альдегидом сохраняет морфологию бактериальных клеток, целостность поверхностных структур, эпитопы и рецепторы для прикрепления специфических иммуноглобулинов и бактериофагов.

При проведении исследований были подобраны оптимальные режимы сканирования образцов. Программное обеспечение сканирующего зондового микроскопа Solver P47-PRO позволяет проводить морфометрический анализ клеток микроорганизмов и определять такие параметры, как длина, ширина, периметр клетки, площадь сечения клетки. Морфометрические показатели клеток, установлен-

Морфометрические показатели клеток микроорганизмов

Вид микроорганизма	Длина клетки, по данным АСМ, мкм M±m	Ширина клетки, по данным АСМ, мкм M±m	Среднеквадратичная шероховатость клетки, нм M±m	Размеры клеток согласно литературным данным [3], мкм длина × ширина
<i>Y. pestis</i>	2,27±0,12	0,83±0,03	30±2	1–3 × 0,5–0,8
<i>B. anthracis</i>	2,47±0,09	1,22±0,06	109±11	1,2–10 × 0,5–2,5
<i>F. tularensis</i>	0,70±0,04	0,60±0,02	12±1	0,2–0,7 × 0,2
<i>B. abortus</i>	0,70±0,04	0,60±0,02	28±5	0,6–1,5 × 0,5–0,7
<i>B. melitensis</i>	1,20±0,04	0,45±0,04	23±5	
<i>B. suis</i>	1,00±0,04	0,50±0,04	27±5	
<i>B. canis</i>	0,60±0,04	0,60±0,04	30±5	
<i>B. ovis</i>	0,70±0,04	0,60±0,04	18±5	
<i>B. neotomae</i>	1,00±0,04	0,60±0,04	30±5	
<i>V. cholerae cholerae</i>	2,74±0,10	0,54±0,01	12±1	1,4–2,6 × 0,5–0,8
<i>V. cholerae</i> eltor	1,78±0,06	0,66±0,02	14±1	
<i>V. cholerae</i> O139	2,26±0,16	0,63±0,02	15±1	
<i>V. cholerae</i> nonO1	1,92±0,05	0,56±0,02	18±2	

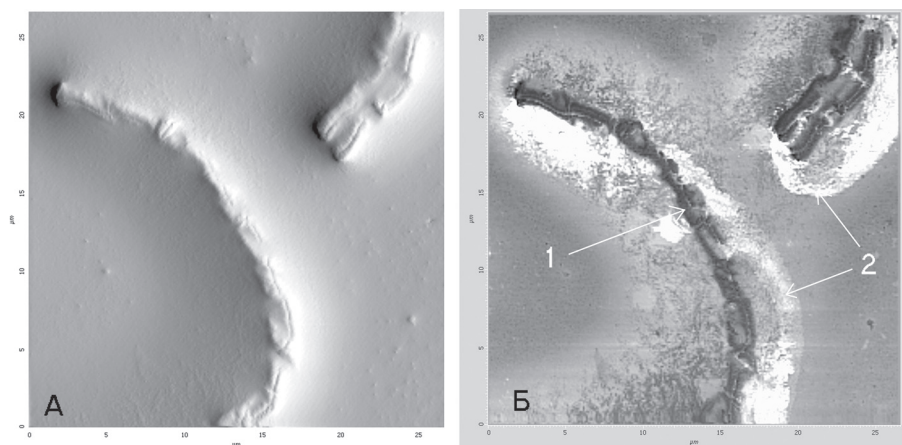


Рис. 1. АСМ-изображение клеток *B. anthracis* 759/79:
 А – метод рассогласования; Б – метод отображения фазы. Увеличение $\times 3000$.
 Стрелками указаны: 1 – вегетативные клетки *B. anthracis*; 2 – капсулоподобное вещество

ные с помощью АСМ соответствовали литературным данным (таблица). АСМ позволяет определять также трехмерные характеристики бактериальных клеток (высоту, объем, среднеквадратичную шероховатость поверхности клеток). Показатель шероховатости поверхности клеток (таблица) указывает на степень укладки пептидогликана и может служить дополнительной характеристикой клеток.

Для увеличения разрешения АСМ-изображений и выявления структур в нанометровом диапазоне был использован полуконтактный метод рассогласования АСМ и метод отображения фазы (рис. 1). При этом было обнаружено капсулоподобное вещество, окружающее цепочки клеток возбудителя сибирской язвы *B. anthracis*, не выявляемое обычными методами АСМ, и жгутики у холерного вибриона (рис. 2). Преимущества АСМ связаны с отсутствием специальных методов окрашивания для выявления спор, капсул, жгутиков бактерий, используемых в световой микроскопии.

Таким образом, в результате проведенных исследований подобраны оптимальные условия подготовки и анализа образцов возбудителей особо опасных инфекционных болезней с использованием методов атомно-силовой микроскопии, включающие выбор подложки, режима обеззараживания и фиксации об-

разцов, сканирования и использования различных методов атомно-силовой микроскопии для повышения информативности, разрешающей способности метода и выявления субклеточных структур в нанометровом диапазоне.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арчаков А.И., Згода В.Г., Иванов Ю.Д., Кайшева А.Л., Крохин Н.В., Плешакова Т.О. и др. Визуализация и идентификация вирусных частиц гепатита при помощи атомно-силовой микроскопии, сопряженной с МС/МС анализом. Биомедицинская химия. 2010; 1:26–39.
2. Миронов В.Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии. Нижний Новгород; 2004. 114 с.
3. Холт Дж., редактор. Определитель бактерий Берджи. М.; 1997. 432 с.
4. Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)». СП 1.3.1285-03». М.; 2003.
5. Федорова Л.И., Арефьева Л.С., Путинцева Н.А., Веремкович Н.А. Современные средства дезинфекции и дезинсекции. Характеристика, назначение, перспективы. М.; 1991. 51 с.
6. Chada V.G.R., Sanstad E.A., Wang R., Driks A. Morphogenesis of *Bacillus* Spore Surfaces. J. Bacteriol. 2003; 185(21):6255–61.
7. Dufrene Y.F. Application of atomic force microscopy to microbial surfaces: from reconstituted cell surface layers to living cells. Micron. 2001; 32:153.
8. Razatos A., Ong Y.-L., Sharma M.M., Georgiou G. Molecular determinants of bacterial adhesion monitored by atomic force microscopy. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1998; 95(19):11059–64.
9. Stukalov O., Korenevsky A., Beveridge T.J., Dutcher J.R. Use of atomic microscopy and transmission electron microscopy for correlative studies of bacterial capsules. Appl. Environ. Microbiol. 2008; 74(17):5457–65.
10. Vellido-Rodriguez V., Beveridge T.J., Dutcher J.R. Surface viscoelasticity of individual gram-negative bacterial cells measured using atomic force microscopy. J. Bacteriol. 2008; 190(12):4225–32.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Archakov A.I., Zgoda V.G., Ivanova Yu.D., Kaisheva A.L., Krokhin N.V., Pleshakova T.O. et al. [Visualization and identification of hepatitis C viral particles by atomic force microscopy combined with MS/MS analysis]. Biomeditsin. Khim. 2010; 1:26–39.
2. Mironov V.L. [Fundamentals of Scanning Probe Microscopy]. Nizhniy Novgorod; 2004. 114 p.
3. Holt J., editor. [Bergey's Manual of Determinative Bacteriology]. M.; 1997. 432 p.
4. Sanitary and Epidemiological Rules. [Safety Work with Microorganisms of I–II Groups of Pathogenicity (Danger)]. SP 1.3.1285-03. M.; 2003.
5. Fedorova L.I., Aref'eva L.S., Putintseva N.A., Veremkovich N.A. [Modern Techniques of Disinfection and Desinsection. Characteristic, Application and Prospects]. M.; 1991. 51 p.

Authors:

Utkin D.V., Kuznetsov O.S., Erokhin P.S., Spitsyn A.N., Volokh O.A., Osina N.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Уткин Д.В., Кузнецов О.С., Ерохин П.С., Спицын А.Н., Волох О.А., Осина Н.А. Росийский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

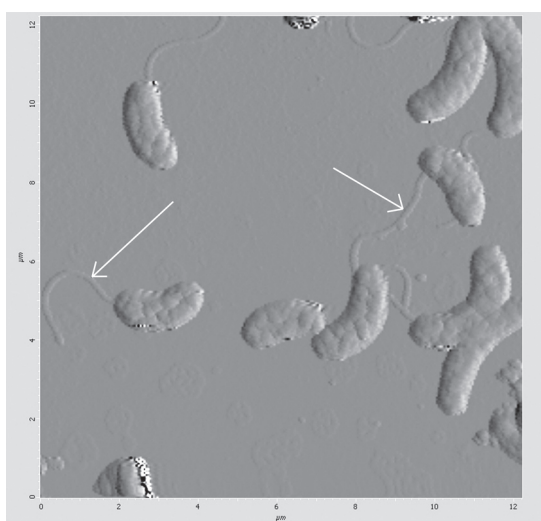


Рис. 2. АСМ-изображение клеток *V. cholerae* eltor M1289. Метод рассогласования. Увеличение $\times 8000$. Стрелками указаны жгутики холерного вибриона

Поступила 11.11.11.