КОМИТЕТ ПО ЗДРАВООХРАНЕНИЮ ПРАВИТЕЛЬСТВА

САНКТ – ПЕТЕРБУРГА

МЕТОДИКА МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ МИКРОБНЫХ МАРКЕРОВ КАК СПОСОБ ОЦЕНКИ ПРИСТЕНОЧНОЙ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ОРГАНОВ ПИЩЕВАРЕНИЯ

Учебно-методическое пособие

Под редакцией Г.А.Осипова, В.П.Новиковой

Санкт-Петербург - 2013

КОМИТЕТ ПО ЗДРАВООХРАНЕНИЮ ПРАВИТЕЛЬСТВА

САНКТ – ПЕТЕРБУРГА

СОГЛАСОВАНО	УТВЕРЖДАЮ
Главный гастроэнтролог	Заместитель председателя
Комитета по здравоохранению	Комитета по здравоохранению
Правительства Санкт-Петербурга	Правительства Санкт-Петербурга
_____ проф. Е. И. Ткаченко	_____В. Е. Жолобов
«_____»_____2013 г.	«_____»_____2013 г.

МЕТОДИКА МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ МИКРОБНЫХ МАРКЕРОВ КАК СПОСОБ ОЦЕНКИ ПРИСТЕНОЧНОЙ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ОРГАНОВ ПИЩЕВАРЕНИЯ

Учебно-методическое пособие

Под редакцией Г.А.Осипова, В.П.Новиковой

Санкт-Петербург - 2013

Методика масс-спектрометрии микробных маркеров как способ оценки пристеночной кишечной микробиоты при заболеваниях органов пищеварения. Учебно-методическое пособие. – Санкт-Петербург , 2013. -83 с.

Учебно-методическое пособие подготовлено на основе результатов многолетних комплексных исследований, направленных на изучение микробиоценоза кишечника у больных с заболеваниями органов пищеварения. Учебно-методическое пособие предназначено для терапевтов, педиатров, гастроэнтерологов, семейных врачей, интернов, клинических ординаторов и студентов медицинских ВУЗов.

Учебно-методическое пособие разработали:
Г.А. Осипов – доктор биологических наук, профессор Академической группы Академика РАМН Ю.Ф.Исакова при Научном центре сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н.Бакулева
Н.Б. Бойко – младший научный сотрудник, врач-микробиолог Академической группы Академика РАМН Ю.Ф.Исакова при Научном центре сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н.Бакулева
В.П.Новикова – доктор медицинских наук, профессор кафедры пропедевтики детских болезней ГБОУ ВПО СПБГПМУ Минздрава России
Н.Ф. Федосова – кандидат медицинских наук, заведующая контрольно-диагностической лабораторией ФГУ Лечебно-реабилитационный центр Минздрава России
О.М. Цех– кандидат медицинских наук, гастроэнтеролог санатория «Сестрорецкий Курорт».
Е.А.Земскова - аспирант кафедры педиатрии и детской кардиологии ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России
Е.В.Токарева–врач ООО «Центр Дисбиозов».

Рецензент:
З.д.н., доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой пропедевтики внутренних болезней. Северо-Западного Государственного Медицинского Университета им. И.И. Мечникова Ткаченко Е.И

Содержание

I. Введение
1.Актуальность внедрения в практическое здравоохранение метода масс-спектрометрии микробных маркеров
2.Общая характеристика и документирование метода масс-спектрометрии микробных маркеров
II. Традиционная трактовка дисбактериоза кишечника и синдрома избыточного бактериального роста тонкой кишки.
III. Описание методики ГХ-МС анализа
1. Список маркеров и их отнесение к микроорганизмам
2. Клинические материалы и средства измерений
3. Подготовка пробы к хромато-масс-спектрометрическому анализу
4. Проведение ГХ-МС анализа в режиме мультиионной масс-фрагментографии
5. Интерпретация результатов. Выявление таксономически значимых жирных кислот
IV. Микробиота кишечника и фекалий по данным масс-спектрометрии микробрых маркеров
V. Микробиота кишечника при заболеваниях органов пищеварения и ее нозологическая специфичность.
1. Реконструкция микробиоты по данным состава микробных маркеров в крови при хроническом гастродуодените у детей.
2. Нозологическая специфичность дисбиоза при функциональных заболеваниях кишечника.
3. Нозологическая специфичность дисбиоза при лямблиозе у детей.
4. Энтероколит и дисбиотические изменения в микроэкологическом статусе у детей
5. Особенности пристеночной микробиоты при воспалительных заболеваниях толстой кишки у детей
6. Реакция пристеночной микробиоты толстой кишки на использование препарата Альфа-Нормикс в лечебном процессе
VI. Коррекция понятий об инфекции и дибиозе и дополнения к лечебным мероприятиям в связи с расширением круга диагностируемых микроорганизмов
1. Вместо стадий дисбиоза – количественные отклонения по значимым микробам и сумме, эндотоксин, инфекционная нагрузка, плазмалоген –показатель здоровья
2. Еще о нозологической специфичности – заметки о первых анализах.
3. Выбор антибиотиков и коррекция лечения
4. Применение пробиотиков и других корректоров микробиоты кишечника
5. Модификация понятий и клинической процедуры при адаптации метода масс-спектрометрии микробных маркеров в клинической микробной диагностике
VII. Заключение. Место масс-спектрометрии микробных маркеров в исследовании микроэкологии человека

Список сокращений и применяемых терминов

ААД- антибиотико-ассоциированная диаррея

АИТ-аутоимунный тиреоидит

АТ-антитела

АТД-атопический дерматит

БК- болезнь Крона

ВЗК – воспалительные заболевания кишечника

ГХ-МС – газовая хроматография – масс-спектрометрия

ДПК – двенадцатиперстная кишка

ЖК-жирные кислоты

КОЕ-колониобразующая единица

ЛПС-липополисахариды

МСММ – масс-спектрометрия микробных маркеров

МФ- масс-фрагментография

НР – Helicobacter pylori

ПЦР-полимеразная цепная реакция

ПМР-протонно-магнитный резонанс

ППМ -предсказательная, предупредительная, персонифицированная медицина

CRC- колоректальный рак

СИБР – синдром избыточного бактериального роста

СХУ – синдром хронической усталости

УГТ- урогенитальный тракт

ХГ- хронический гастрит

ХГД – хронический гастродуоденит

ЦМВ-цитомегаловирус

ЩЖ–щитовидная железа

ЯБДК – язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки

ЯК-язвенный колит

ЯМР-ядерно-чагнитный резонанс

Микробиота- современный термин для обозначения сообщества микроорганизмов, соответствует переводу с латинского.

Микрофлора-ранее используемый термин, соответствующий современному понятию микробиота. Мы частично оставляем термин микрофлора там, где идет ссылка на определения в ранних документах и других первоисточниках.

I. Введение

Настоящие методические рекомендации предназначены для ознакомления специалистов разных направлений, связанных с микроэкологией человека, с новыми представлениями о значимости микробов, населяющих наше тело, в обеспечении внутренних органов и кожи биологически активными веществами и взаимодействии с организмом-хозяином в норме и патологии. Это направление интенсивно развивается с начала 21 века и основывается на представлении организма человека как суперорганизма в совокупности с населяющими его микробами. Важность такого подхода стала очевидной после того, как было обнаружено превосходство численности микробных клеток по сравнению собственными клетками человеческого тела, а главное стократного преимущества микробов в генетическом потенциале. Стала понятной огромная роль микроорганизмов не только в патологических проявлениях, но и в поддержании системного гомеостаза. В связи с этим образовалось ряд направлений в общебиологическом подходе к надорганизменному изучению физиологии человека в норме и патологии. Они получили общий термин «омики»: геномика, протеомика, микробиомика, метаболомика.

Исследование взаимодействий микробиота-хозяин стало возможным благодаря развитию некультуральных, молекулярных высокотехнологичных методов анализа: хроматография, масс-спектрометрия, ядерный магниный резонанс, лазерные технологии и их различные сочетания. Предполагается, что такой инструментарий позволит решать проблемы нового всемирного направления здравоохранения – предсказательной, предупредительной, персонифицированной медицины (ПППМ). Как оказалось, масс-спектрометрия микробных маркеров уже сейчас является не только методом исследования микробной составляющей суперорганизма, но и инструментом рутинной клинической микробной диагностики и мониторинга инфекции и дисбиозов. На наш взгляд это готовый инструмент ПППМ.

МССМ представляет дополнительные данные по микробиоте кишечного тракта и слизистых оболочек других органов, которые позволяют уточнить в качественном и количественном отношении их заселенность микроорганизмами в норме и патологии.

1.Актуальность внедрения в практическое здравоохранение метода масс-спектрометрии микробных маркеров

Применяемые на сегодняшний день в клинической практике методы диагностики инфекции имеют определенные ограничения и недостатки. Например, существенным недостатком классического бактериологического исследования, помимо дороговизны и длительности (7-10 дней), является невозможность оценить роль некультивируемых микроорганизмов в инфекционно-воспалительном процессе, прежде всего – анаэробов. Используемый в качестве дополнительного к классическому и**ммуно-серологический метод** является непрямым - определяется не возбудитель, а иммунный ответ на него, который может

иметь индивидуальные вариации. Известные молекулярно-биологические методы (ПЦР, гибридизация РНК и ДНК), при несомненных преимуществах - прямое определение возбудителя, высокие специфичность и чувствительность, универсальность, скорость, возможность диагностики хронических и латентных инфекций – имеют такие серьезные недостатки, как частые ложно-положительные результаты и невозможность адекватной количественной оценки. [Михайлова, 2008, Fenollar, 2006; Persing,1991]. Из всего вышесказанного вытекает востребованность в надежном экспрессном методе диагностики возбудителей инфекции.

Сложный симбиоз с микроорганизмами влияет на метаболизм, физиологию и экспрессию генов хозяина, поэтому возникло предположение, что человека надо рассматривать с общебиологических позиций как сложный биологический суперорганизм, в котором единое целое составляют собственные клетки хозяина, так и населяющих его микроорганизмов (Kinross, 2008). Состав микробиоты кишечника здоровых людей зависит от генотипа хозяина, диеты, возраста и пола и подвержена влиянию лекарственных препаратов (в особенности антибиотиков). Наблюдаемый метаболический фенотип человека в свою очередь сильно зависит от кишечного микробиома (Шендеров, 1998; Ткаченко, 2004; Nicholson, 2005; Ткаченко, 2009; Osipov, 2011). Метаболические продукты хозяина и микробиоты неразрывно связаны, пересекаются и также подвержены диетическим вариациям. Для изучения этих взаимодействий и переплетений метаболизма необходимо понять какие из человеческих метаболических путей наиболее тесно связаны со структурными вариациями кишечной микробиоты. На сегодня эти работы остаются предметом поиска научных лабораторий мира, но не рутинной клинической лабораторной практики. Тогда как отечественные работы последнего десятилетия показали возможность использования ГХ-МС микробных маркеров и метаболитов (метаболомики и микро-метаболомики в современной терминологии) в качестве новой медицинской технологии не только для научных исследований, но и для рутинного клинического анализа и мониторинга инфекций и дисбиозов.

Метод газовой хроматографии масс-спектрометрии (ГХ-МС) позволяет детектировать в исследуемых образцах маркеры – компоненты микробной клетки – широкого спектра микроорганизмов собственной и инородной микробиоты человека. Метод является высокочувствительным, экспрессным (2,5 часа на полный цикл исследования), универсальным, экономичным и имеет широкий диагностический спектр. Он легко поддается стандартизации, для его реализации используются доступные любым лабораториям химические реактивы и методики пробоподготовки. Метод автоматизирован, что обуславливает простоту лабораторной диагностики.

2. Общая характеристика и документирование метода масс-спектрометрии микробных маркеров

Метод детектирования микроорганизмов по видоспецифичным высшим жирным кислотам (ЖК) клеточной стенки сходен с генетическим анализом (ПЦР, определение последовательности нуклеотидов 16sРНК и пр.), поскольку состав жирных кислот детерминирован в ДНК и воспроизводится путем репликации участка генома транспортными РНК и последующего синтеза ЖК в митохондриях по матричным РНК. Для реализации метода используется хромато-масс-спектрометрия с мультиионным селективным детектированием структурных ЖК – маркеров микроорганизмов. Для простоты будем называть далее эту процедуру методом масс-спектрометрии микробных маркеров (МСММ).

Контроль микроэкологического статуса человека уже сейчас является проблемой практического здравоохранения. Следует признать, что классические бактериологические методы затруднительно использовать для ее эффективного решения. Контролировать состав пристеночной микробиоты кишечника и других органов оказалось возможным с помощью метода газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией по содержащимся в клеточной стенке длинноцепочечным жирным кислотам (ЖК) и жирным альдегидам фосфолипидов. Существо анализа состоит в прямом извлечении с помощью химической процедуры высших жирных кислот из образца, подлежащего исследованию (например, биоптата кишечной стенки или крови), их разделения на хроматографе в капиллярной колонке высокого разрешения и анализа состава в динамическом режиме на масс-спектрометре.

Обнаруженный в результате систематических исследований гомеостаз микробных маркеров в крови и адекватность его профиля составу кишечной микробиоты здорового человека обеспечил уникальную возможность мониторировать ее состояние неинвазивным экспрессным методом – по анализу крови. Метод позволяет одновременно контролировать маркеры практически всех клинически значимых (более 10^4 клеток/мл) микроорганизмов – симбионтов человека. Поэтому анализ крови используется в настоящее время в ряде клиник России для изучения микроэкологического статуса внутренних органов и кожи человека, обнаружения воспалений неизвестной этиологии, определения антигенов и их носителей при раневой и послеоперационной инфекции, перитоните, септических состояниях, лихорадках, заболеваниях респираторной и мочеполовой сферы. Метод около пятнадцати лет проходил апробацию медицинских учреждениях г. Москвы. В 2010 году Росздравнадзором разрешено его применение в качестве новой медицинской технологии «Оценки микроэкологического статуса человека методом хромато-масс-спектрометрии» на территории Российской Федерации (Разрешение ФС 2010/038 от 24.02.2010).

Методика, алгоритм и основные постулаты диагностической процедуры отражены в описании патентов:

- Осипов Г.А. Способ определения родового (видового) состава ассоциации микроорганизмов. //Патент РФ № 2086642. C12N 1/00, 1/20, C12Q 1 /4. Приоритет от 24 дек.1993г
- Осипов Г.А. Шабанова Е.А. Недорезова Т.П. Истратов В.Г. Сергеева Т.И. Способ диагностики клостридиальной анаэробной газовой инфекции. Патент РФ №2021608 кл.G01N 33/50.- Зарегистрировано в гос.реестре 15.10.94.- Бюл.№19.
- Осипов Г.А., Белобородова Н.В. Патент на изобретение № 2146368 «Способ выявления возбудителя инфекционного процесса в стерильных биологических средах макроорганизма», Патент зарегистрирован в Госреестре изобретений РФ 10.03 2000 г

Развитие клинических приложений метода МСММ приведено в пособиях для врачей:

- Роль анаэробов в возникновении урогенитальных инфекций. Пособие для врачей. Утверждено секцией №14 Ученого Совета МЗ РФ по проблеме "Кожные болезни, заболевания, передаваемые половым путем" Протокол №3 от 9 сентября 1997 г. ЦНИКВИ, 1998, 16 с.
- Бондаренко В.М., Грачева Н.М., Мацулевич Т.В. «Дисбактериозы кишечника у взрослых», КМК Scientific Press, Москва 2003, с. 88-98
- Осипов Г.А., Крымцева Т.А., Осипов Д.Г., Столярова О.Н. Функциональные изменения жирнокислотного состава урогенитальных жидкостей организма человека при дисбиозах. Учебно-методическая литература. Прометей. Москва, 2005, 85с.
- Бондаренко В.М., Мацулевич Т.В. Дисбактериоз кишечника как клинико-лабораторный синдром. Руководство для врачей. Москва, издательская группа «ГЭОТАР-Медиа», 2007, с. 134-138.

II. Традиционная трактовка дисбактериоза кишечника и синдрома избыточного бактериального роста тонкой кишки.

Для последующего сопоставления результатов МССМ и бактериологических методов, целесообразно вначале представить краткий обзор традиционных представлений о дисбактериозе кишечника.

Впервые термин «дисбактериоз» ввел A. Nissle в 1916 году, первоначально понимая под этим термином изменения, касающиеся только кишечной палочки [Nissle, 1916]. Согласно ГОСТу 91500.11.0004-2003, дисбактериоз это клинико-лабораторный синдром, возникающий при ряде заболеваний и клинических ситуаций, представлен изменением качественного и/или количественного состава нормальной микрофлоры, метаболическими и иммунными

нарушениями, сопровождающимися у части больных клиническими проявлениями [Гриневич, 2002]. В настоящее время, как в отечественной, так и в зарубежной литературе используется термин «дисбиоз», который подразумевает наличие изменений не только бактерий, но также и вирусов, риккетсий, грибов [Григорьев, 2000]. Обращает внимание отсутствие в МКБ-10 диагноза «Дисбактериоз кишечника», а клинические проявления этого синдрома расцениваются как проявления синдрома раздраженного кишечника [Международная, (МКБ)–10].

В настоящее время единой классификации в определении степени дисбактериоза нет в связи с разными клинико-лабораторными критериями оценки нормального состава кишечной микробиоты [Данилова, 2001, Минушкин, 1999]. Большинство авторов придерживается классификации по степени тяжести, основанной на данных клинического и микробиологического (оценка качественного и количественного состава микрофлоры) исследования, и выделяют четыре степени дисбактериоза кишечника [Гриневич, 2002]. Толстая кишка отличается многообразием микроорганизмов, основная масса представлена анаэробами (70%) - бифидобактерии и бактероиды, а в качестве «сопутствующей популяции» выступают лактобациллы, кишечная палочка, энтерококки [Ардатская, 2004, Бондаренко, 2003, Шендеров, 1998].

При заболеваниях гастродуоденальной области практически в 100% случаев выявляется дисбиоз ЖКТ. Хорошо изучена частота дисбиоза толстой кишки у взрослых: при НР-ассоциированной ЯБДК - в 100% случаев, преимущественно второй степени тяжести (69%) [Захарченко, 2003], при НР-ассоциированном ХГД, дисбиоз кишечника встречается в 80-100% случаев, 1-3 степени тяжести (69%) [Барышникова, 2006, Козлова, 2004]. НР оказывает не только отрицательное воздействие на СО желудка и ДПК, но и приводит к развитию антибиотикозависимого дисбиоза ЖКТ, вызывает вторичный иммунодефицит вследствие нарушения функционирования гуморального звена иммунной системы, что является важным звеном в патогенезе НР-ассоциированных заболеваний [Ткаченко, 2006]. У взрослых больных дисбаланс Т-хелперного-Th1 иммунного ответа связывают с развитием НР-ассоциированного ХГД, что доказывается эффективностью использования препаратов для улучшения микрофлоры кишечника. Молочнокислые бактерии повышают продукцию ИЛ-1β, ИЛ-6, а лактобациллы способствуют повышению уровня интерферона [Назаретян, 2005, Forchielli, 2005]. У взрослых с ХГД степень обсемененности НР слизистой оболочки тела желудка достоверно связана со снижением содержания бифидо- и лактобактерий и повышением уровня в кишечном содержимом условно-патогенных микроорганизмов и стафилококков [Барышникова, 2006]. У взрослых около 36% всех дисбиозов кишечника протекают с избыточным интестинальным ростом *Candida spp*. [Шевяков, 2003]. У детей с ХГД частота дисбиоза колеблется от 78,1% до 80,2% случаев, а также доказано снижение активности Т-

клеточного звена в иммунной системе [Назаретян, 2005, Ouwehand, 2002]. У детей с НР-ассоциированным ХГД также отмечается избыточный рост в толстой кишке грибов рода *Candida* и появление патогенной микрофлоры [Бурова, 2003, Sheu, 2002].

В настоящее время актуально изучение дисбиоза отдельных биотопов ЖКТ. Термин «синдром избыточного бактериального роста» (bacterial overgrowth syndrome, СИБР) отражает дисбиоз в тонкой кишке. Он оценивается по составу просветной микробиоты, которая является не биопленкой, а просветной планктонной микрофлорой, состоящей из микроорганизмов, ушедших от пристеночного слоя или нисходящих в составе пищевого химуса. Критерием наличия СИБР в двенадцатиперстной кишке является обнаружение бактерий больше или равно 10^4КОЕ/мл (для детей) и 10^5 КОЕ/мл (для взрослых) содержимого, или обнаружение в аспирате микроорганизмов характерных для микробиоценоза толстой кишки, таких как энтеробактерии, бактероиды, клостридии и др. [Бондаренко, 2003, Пасечников, 2004]. В ДПК видовой состав бактерий в норме представлен: лактобактериями, бифидобактериями, бактероидами, энтерококками и дрожжеподобными грибами [Бондаренко, 2003, Урсова, 2003, Gibson, 1995, Nissle, 1916]. Частота СИБР в тонкой кишке у взрослых колеблется от 70 до 97% при хроническом гастрите, язвенной болезни, хроническом холецистите - [Pawlik, 2002]. В педиатрической практике мало данных по частоте СИБР при различных заболеваниях органов пищеварения. Факторами защиты тонкого кишечника, определяющих постоянство видового и количественного состава микрофлоры данного биотопа являются - непрерывная перистальтика тонкой кишки, кислотность желудочного сока, секреция иммуноглобулина А, целостность нормальной слизистой оболочки кишечника, генетическая предрасположенность, анатомические сфинктеры ЖКТ, бактерицидные вещества, вырабатываемые слизистыми оболочками (лизоцим, лактоферрин и др.), фагоцитарная активность макрофагов слизистой оболочки [Белоусова, 2009]. Состав микрофлоры каждого биотопа пищеварительного тракта различается, но остается постоянным, что связано со способностью бактерий фиксироваться к строго определенным рецепторам эпителиальных клеток слизистой оболочки. В тонкой кишке имеются рецепторы для адгезии преимущественно аэробной флоры, а в толстой кишке преобладают рецепторы для фиксации анаэробных штаммов [Gibson, 1995].

Согласно существующим представлениям микрофлора в верхних отделах тонкой кишки (двенадцатиперстной, тощей, проксимальном отделе подвздошной кишки) представлена стрептококками и лактобактериями при отсутствии облигатно-анаэробных бактерий и энтеробактерий. Состав микрофлоры дистальной части подвздошной кишки в норме существенно отличается: возрастает общее число бактерий и к описанным выше обитателям присоединяется факультативно анаэробная грамотрицательная кишечная палочка, факультативно анаэробные энтерококки, облигатно анаэробные бактерии (бактероиды,

клостридии, вейонеллы, бифидобактерии). Доминирование аэробных грамположительных бактерий и дрожжеподобных грибов над кишечной палочкой и облигатно-анаэробными бактериями в начальной части, приблизительно равно количеству аэробных и анаэробных бактерий в средней части, и анаэробные бактерии преобладают в дистальных отделах подвздошной кишки, ближе к баугиниевой заслонке. В биотопе обнаруживается 10^6-10^7 бактериальных клеток в 1 г содержимого кишечника.

Патологическое заселение тонкой кишки толстокишечными бактериями более чем 10^5 КОЕ/мл практически всегда сопровождается клиническими проявлениями, такими как, секреторная и осмотическая диарея, метеоризм и явления мальабсорбции. При длительной персистенции нетипичной флоры в тонкой кишке развиваются симптомы мальабсорбции белка и жира, гиповитаминоза А, D, Е, К и B_{12}, нарушения в обмене холестерина, снижение массы тела, куриная слепота, остеомаляция, изменения кожи и слизистых оболочек (трофологическая недостаточность) [Ciancio, 2002, Giannella-1974].

Избыточное размножение бактерий в тонкой кишке является дополнительным фактором, поддерживающим воспаление слизистой оболочки, снижающим продукцию ферментов (в наибольшей степени лактазы) и усугубляющим нарушение переваривания и всасывания [Ciancio, 2002]. По последним данным изолированный СИБР не влияет на морфологию слизистой оболочки ДПК, поэтому СИБР надо рассматривать как этиологический фактор утяжеляющий течение основного заболевания [Paul, 2010]. СИБР снижает активность ферментов щеточной каймы, в результате этого наблюдается непереносимость углеводов у этих пациентов [Castiglione, 2000, Oumi, 2000, Pimentel, 2006]. Для диагностики СИБР чаще всего используют бактериологическое исследование посева дуоденального аспирата или биоптата с подсчетом содержания микроорганизмов [Мубаракшина, 2008, Bures, 2010, Toskes, 1993], что технически трудно выполнимо.

III. Описание методики ГХ-МС анализа

1. Список маркеров и их отнесение к микроорганизмам

Известно, что состав жирных кислот микроорганизмов видоспецифичен и используется для их идентификации в чистой культуре [Митрука, 1978, Chemical Methods, 1985, Stead, 1992]. Кроме того, у многих микробов имеются индивидуальные маркеры специфичные для таксонов разного уровня (семейства, рода или вида), по которым их можно определять количественно в объектах окружающей среды и клинических пробах [Белобородова, 1999 , Кцоян, 2002, Осипов, 1996, Крымцева,2003, Турова, 1996, Osipov 1997]. Суть анализа состоит в прямом извлечении с помощью химической процедуры высших жирных кислот из подлежащего исследованию образца, их разделения на хроматографе в капиллярной колонке

высокого разрешения и анализа состава в динамическом режиме на масс-спектрометре. Поскольку хроматограф соединен в едином приборе с масс-спектрометром и снабжен компьютером с соответствующими программами автоматического анализа и обработки данных, сам процесс анализа занимает 30 мин, а с учетом времени пробоподготовки и расчета данных - не более 2,5 часов. Его результатом является количественное определение состава микроорганизмов пристеночной микробиоты кишечника.

К настоящему времени состав жирных кислот большинства микроорганизмов изучен, показана его воспроизводимость, оценена родо- и видоспецифичность (табл. 1).

Таблица 1

Высшие жирные кислоты, альдегиды и стерины в составе клеточной стенки с отнесением к микроорганизмам, у которых они наиболее часто встречаются.

№	Обозначение*	Название	Микроорганизмы
1.	C10	декановая	*Streptococcus, Rhodococcus terrae*
2.	iC10	изодекановая	
3.	i11		p. *Xanthomonas, p. Flexispira – 16%*
4.	C12:0	лауриновая	большинство видов микроорганизмов, группа клостридий, p. *Arcobacter, p.Flexibacter - 16%*
5.	C12:1	додеценовая	p. *Rhodobacter*
6.	iC12	изолауриновая	*Peptostreptococcus anaerobius*
7.	iC13	изотридекановая	*Bacteroides, Butyrivibrio, Riemerella, Stenotrophomonas maltophilia, Bacillus subtilis, Brtvibacterium (13%)*
8.	a13	антеизотридекановая	*Bacillus cereus, Brevibacterium*
9.	13:0	тридекановая	*p. Selenomonas (oral)*
10.	i14	изомиристиновая	pp. *Streptomyces, Bacillus, Bacteroides, Legionella, Kurthia, Peptostreptococcus anaerobius, актинобактерии, Eubacterim leutum*
11.	14:1Δ9	9,10- тетрадеценовая	pp. *Sphaerotilus, Clostridium, Streptococcus pneumoniae*
12.	a14:1		*Curtobacterium psychrophilum*
13.	14:1Δ11	11,12-тетрадеценовая	*Acetobacterium, Simonsiella, Kingella kingae, Nocardia, гомоацетатные*
14.	14:0	миристиновая	pp. *Lactobacillus, Helicobacter, Campylobacter, Streptococcus,* ***Clostridium tetany****, Gilardy rods*
15.	2Me14		*Mycobacterium gordonae-2-12%*
16.	i15:1	изопентадеценовая	pp. *Desulfovibrio, Flavobacterium*
17.	15:1Δ9	9,10-пентадеценовая	*Cytophaga -7,4 %, Stigmatella -3,5 %, Selenomonas-7-13 %, Desulfotomaculum, Cl. putrefaciens, Cl. sporogenes,* ***Cl. propionicum,*** *Bacteroides hypermegas*

18.	i15	изопентадекановая	многие виды микроорганизмов DF3-like р.*Riemerella, Flavobacterium breve,Propionibacterium, Bacteroides*
19.	a15	антеизопентадекановая	многие виды микроорганизмов, Azotobacter – 80%, Staphylococcus, Bacillus, коринеформные
20.	15cyc	циклопентадекановая	
21.	15:0	пентадекановая.	большинство видов микроорганизмов, минорный компонент *Cytophaga-16 %, Selenomonas-28 %, Cl. sporogenes, Bacteroides succinogenes, Bact. ruminicola -25-30 % , P. stutzeri* 23%
22.	15:1Δ11	11,12-пентадекановая	
23.	i16:1	изогексадеценовая	*Pseudonocardia*
24.	16:1Δ7	7,8-гексадеценовая	Группа *Clostridium ramosum*, 11 видов
25.	16:1Δ9	9,10-гексадеценовая	большинство видов микроорганизмов
26.	16:1Δ11	11,12-гексадеценовая	рр. *Bdellovibrio, Vibrio, Nocardia, Ruminococcus, Rhodococcus rhodochrous, Bacteroides amylophilus, Sporocytophaga myxococcoides(oral), Desulfobacterium, Sphingomonas capsulata*
27.	i16:0	изопальмитиновая	***Streptomyces***, *Nocardiopsis, Bacillus (термофилы), Bacteroides, Micromonospora, Brevibacterium, Corynebacterium* гр. *betae,*
28.	10Me16	10-метил-гексадекановая	*Rhodococcus*
29.	16:0	пальмитиновая	большинство видов микроорганизмов
30.	i17:1	изопентадеценовая	Campylobacter mucosales, *Flavobacterium, Micromonospora*
31.	17:1	гептадеценовая	*Mycobacterium, Nocardiopsis, Clostridium,* ***Candida****, Moraxella,*
32.	i17:0	изогептадекановая	*Bacillus, Propionibacterium, Prevotella*
33.	a17:0	антеизогептадекановая	*Corynebacterium, Bacteroides, Nocardiopsis, Nocardia, Micromonospora*
34.	17cyc	циклогептадекановая	сем. *Enterobacteriaceae*, рр. *Pseudomonas, Desulfobacter, Alcaligenes, Bordetella, Afipia*
35.	17:0	гептадекановая	большинство видов микроорганизмов, минорный компонент
	10Me17		*Micromonospora*
36.	17chex	ω-циклогексил-ундекановая	р. *Sulfobacillus, Bacillus acidocaldarius*
37.	a17:1	антеизогептадеценовая	р. *Desulfotomaculum, Desulfovibrio*
38.	18:4	октадекатетраеновая	некоторые грибы и дрожжи
39.	18:3	ланоленовая	грибы и дрожжи
40.	18:2	линолевая	грибы, дрожжи, простейшие
41.	18:1Δ9	олеиновая	все организмы

	i18:1 H		*Enterococcus faecalis, Fil. str*
42.	18:1Δ11	цис-вакценовая	сем. *Enterobacteriaceae,* pp.*Nitrobacter, Bdellovibrio,* ***Lactobacillus****, Streptococcus, Succinivibrio, Campylobacter, Fusobactrium, Pseudomonas; Brucella, Achromobacter, Cardiobacterium hominis*
43.	18:0	стеариновая	Все организмы
44.	i18	изооктадекановая	*pp. Peptostreptococcus, Bifidobacterium, Nocardiopsis, Bacillus subtilis,* ***Clostridium difficile***
45.	10Me18	10-метил-октадекановая (туберкулостеариновая)	p. *Mycobacterium, Nocardia; Corynebacterium bovis,* группа *C. xerosis, C.urealyticum,*
46.	18:1Δ7	7,8-октадеценовая	грибы, эукариоты
47.	ω-цг19	циклогексилтридекановая	
48.	Rlt = 18,1 br.19:1 (11Me18:1)		*Afipia, Helicobacter mustelae, Achromobacter*
49.	19cyc	Циклононадекановая OFBA (клинич) – 24%	pp. *Lactobacillus,* ***Enterococcus****, Pseudomonas, Brucella, Campylobacter,* сем. *Enterobacteriaceae, Helicobacter pylori, H. mustelae, Pediococcus cerevisiae- 40% , Afipia, гр. Campylobacter coli*
50.	i19	изононадекановая	*Bacillus subtilis, Bacteroides hypermegas*
51.	a19	антеизононадекановая	*Staphylococcus*
52.	19:0	нонадекановая	pp. *Nitrobacter, Bacillus, Serratia; Pseudomonas cepacia*
53.	i19:1		*Afipia (кошачьи царапины)*
54.	19 chex	ω-циклогексил-тридекановая	p. *Sulfobacillus, Bacillus acidocaldarius*
55.	20:4	арахидоновая	простейшие, клетки эукариот
56.	20:1	эйкозеновая	*Propionibacterium jensenii,* ***Actinomyces****, Streptococcus thermophilus, St. salivarius,*
57.	20:0	эйкозановая	*Actinomyces* гр. *bovis*
	20:1Δ11		*Strept. mutans – 13,9%*
58.	Копростанол	холестанол	p. *Eubacterium*
59.	21:0	бегеновая	p. *Francisella*
60.	22:6	докозагексеновая	грибы, эукариоты
61.	22:0	докозановая	p. *Francisella*
	C22:4	арахидоновая кислота	простейшие и высшие организмы
62.	24:0	тетракозановая	p. *Francisella, Mycobacterium,* микроэукариоты
	25:0	пентакозановая	микроэукариоты
63.	26:0	гексакозановая	p. *Mycobacterium* микроэукариоты
Гидрокси-кислоты :			

64.	3h10** - без h12 (или мало)	Гидрокси-декановая	**Bordetella pertussis,*B.parapertussis, Pseudomonas syringae, P. alcaligenes, P. stutzeri, P. mendocina, *Comamonas*
65.	2h10	2-гидрокси-декановая	p. *Pseudomonas*
66.	hi11	Гидрокси-изо-ундекановая	*Stenotrophomonas maltophilia,*
67.	2hi11	2-гидрокси-изо-ундекановая	*Stenotrophomonas maltophilia,*
68.	h11	Гидрокси-ундекановая	*сульфатвосстанавливающие бактерии*
69.	h12:1	Гидрокси-додеценовая	*Pseudomonas aeruginosa*
70.	3h12	Гидрокси-лауриновая	*p. Acinetobacter, Pseudomonas, Vibrio; Neisseria, N. gonorrhoeae, Moraxella, Arcobacter, Eikenella, Suttonella (без 2h12), Kingella, Ps.pertucinogena – h10 и h12 (без 2h12)*
71.	2h12	2-гидрокси-лауриновая	*Pseudomonas putida, P.aeruginosa,* pp. *Acinetobacter, Alcaligenes (без 3h12,но с 3h14), Bordetella (avium, holuopii + 2,3H14)*
72.	hi13	Гидрокси-изотридекановая	*Stenotrophomonas maltophilia,*
73.	3h13	Гидрокси-тридекановая	p. *Selenomonas; Bacteroides hypermegas,*
74.	hi14:1	Гидрокси-изо-тетрадеценовая	
75.	h14:1	Гидрокси-тетрадеценовая	
76.	hi14	Гидрокси-изо-миристиновая	p. *Legionella*
77.	3h14	Гидрокси-миристиновая	pp. *Bordetella, Alcaligenes, Fusobacteriun, Haemophilus, Vibrio, Wolinella, Campylobacter, Neisseria, сем. Enterobacteriaceae*
78.	2h14	2-гидрокси-миристиновая	*Alcaligenes, Burkholderia cepacia, Bordetella (групп 1, 1vc 2), Sphingomonas capsulata, Salmonella*
79.	2hi14	2-гидрокси-изо-миристиновая	
80.	2,3hi14	2,3-дигидрокси-изо-тетрадекановая	p. *Legionella*
81.	3h15	Гидрокси-пентадекановая	*Bacteroides ruminicola*
82.	2h15	2-гидрокси-пентадекановая	*Sphingomonas adhaesiva*
83.	3hi15	Гидрокси-изо-пентадекановая	pp. *Flavobacterium, Capnocytophaga; Bacteroides melaninogenicus, Prevotella, Weeksella*
84.	2hi15	2-гидрокси-изо-пентадекановая	pp. *Flavobacterium, Flexibacter, Weeksella*
85.	3ha15	Гидрокси-антеизо-пента декановая	*Bacteroides ruminicola*
86.	h16	Гидрокси-пальмитиновая	pp. *Erwinia, Brucella, Bacteroides, Wolinella, Cytophaga, Flexibacter, Fusobacterium, Bordetella; Burkholderia cepacia, P. pseudomallei, Campylobacter*

			fetus, C. sputorum, C. fecalis,
87.	h16:1	Гидрокси-гексадеценовая	
88.	2h16	2-гидрокси-пальмитиновая	p. *Flexibacter; Alcaligenes, Burkholderia cepacia, P. pickettii (2h16:1),* клетки эпителия, спермий и другие эукариотические клетки
89.	hi16	Гидрокси-изо-пальмитиновая	
90.	2hi16	2-гидрокси-изо-пальмитиновая	*Streptosporangium*
91.	3hi17	Гидрокси-изо-гептадекановая	pp. *Bacteroides, Flavobacterium, Cytophaga, Flexibacter, Riemerella*
92.	2hi17	2-гидрокси-изо-гептадекановая	p. *Flexibacter*
93.	3h17	Гидрокси-гептадекановая	*Bacteroides ruminicola, B. thetaiotaomicron*
94.	3ha17	Гидрокси-антеизо-гепта-декановая	*Bacteroides ruminicola*
95.	10h18:1	10-гидрокси-октадеценовая	*Clostridium perfringens*
96.	h18	3-гидрокси-стеариновая	pp. *Francisella (F. philomiragia), Brucella, Achromobacter, Helicobacter pylori,*
97.	2h18	2-оксистеариновая	эукариоты (сфинголипид простейших)
98.	10h18	10- оксистеариновая	*Clostridium perfringens*
99.	hi18	Гидрокси-изо-октадекановая	p. *Aquaspirillum*
100.	9,10 epoxy18	9,10-эпоксиоктадекановая	*Pneumocistis carinii*
101.	3h20	Гидрокси-эйкозановая	*Chlamydia trachomatis*
102.	3hi20	гидрокси-изо-эйкозановая	*Chlamydia trachomatis, Legionella*
103.	2h20	2-гидрокси-эйкозановая	клетки эукариотов
104.	3h22	3-гидрокси-докозаиновая	*Chlamydia trachomatis*
105.	2h22	2-гидрокси-докозановая	клетки эукариотов
106.	2h24	2-гидрокси-тетракозановая	Aspergillus, клетки эукариотов
107.	2h26	2-гидрокси-гексакозановая	клетки эукариотов
Спирты:			
108.	16alc	n-пальмитиновый	p. *Moraxella*
109.	18alc, 2-OH h18 alc	стеариновый, 2-OH	p. *Mycobacterium MAIS,* h18 alc – *Moraxella, Micromonospora*
110.	20alc	n-эйкозиловый	*Mycobacteria*
111.	2h20alc	2-оксиэйкозиловый	*Mycobacterium tuberculosis*
112.	22alc	n-докозиловый	
113.	2h22alc	2-оксидокозиловый	*Mycobacterium xenopii*
	2h24alc	2-окситетракозиловый	*Mycobacteria*
	2h26alc	2-оксигексакозиловый	*Mycobacteria*
Альдегиды :			
114.	12a	лауриновый	p. *Butyrivibrio*
115.	13a	тридекановый	p. *Butyrivibrio, Selenomonas*
116.	i14a	изомиристиновый	pp. *Bifidobacterium, Butirivibrio*
117.	14:1Δ9a	9,11-тетрадеценовый	p. *Butyrivibrio, Clostridium fimetarum*
118.	14:1Δ11a	11,12-тетрадеценовый	p. *Butyrivibrio, Clostridium fimetarum*
119.	14a	тетрадекановый	pp. *Butyrivibrio, Bifidobacterium, Spirochaeta,*
120.	i15a	изопентадекановый	pp. *Butyrivibrio, Lactobacillus (rumen), Propionibacterium*
121.	a15a	антеизопентадекановый	p. *Butyrivibrio, Eubacterium,*

			Frigoribacterium, Propionibacterium freudenreichii
122.	15:1a	пентадеценовый	p. *Butyrivibrio*
123.	15a	пентадекановый	p. *Butyrivibrio*
124.	16:1Δ9a	9,10-гексадеценовая	Группа *Clostridium estertheiticum-C.tetani*, p. *Butyrivibrio, Selenomonas, Lactobacillus, Eubacterium, Mobiluncus, Peptostreptococcus anaerobius*
125.	16:1Δ11a	11,12- гексадеценовый	*Clostridium fimetarum*
126.	16a	пальмитиновый	*C. fallax*, pp. *Lachnospira, Butyrivibrio, Lactobacillus*
127.	i17a	изогептадекановый	*Propionibacterium freudenreichii*
128.	a17a	антеизогептадекановый	*Eubacterium, Propionibacterium freudenreichii*
129.	17cyca	циклогептадекановый	*Clostridium bejerinckii*
130.	17a	гептадекановый	*Lactobacillus (rumen)*
131.	i18a	изостеариновый	pp. *Eubacterium, Lachnospira, Butyrivibrio, Bifidobacterium, Selenomonas, Mobiluncus, Clostridium butyiricum*
132.	18:1a	октадеценовый	***Eubacterium***, *Clostridium*
133.	18a	стеариновый	*Clostridium thermocellum*
134.	a16a	антеизопальмитиновый	*Clostridiun acetobutilicum, Cl. butiricum*
135.	19cyca	циклононадекановый	p. *Lactobacillus*
136.	19a	нонадекановый	*Clostridium turobutiricum*
137.	17:1a	гептадеценовый	
Стерины:			
138.		копростанол - холестанол	*Eubacterium*
139.		холестендиол	простой герпес
140.		холостадиенон	цитомегаловирус
141.		Pneumocysterol	*Pneumocystis carini, P. hominis*
142.		campesterol	микроскопические грибы
143.		эргостерол	*Aspergillus +like fungi*
144.		ситостерол, β-ситостерол	микроскопические грибы, растения
145.		холестерин	простейшие и высшие организмы
146.		фитанилглицерины, дифитанилглицерины	метаногены, архебактерии
147.		гопаны	цианобактерии, архебактерии
148.		стераны	метанотрофы
149.			

Вещества приведены в порядке возрастания числа атомов углерода в цепи молекулы, что соответствует хроматографическому времени удерживания

* - Обозначения веществ: 17:1 - 17- число атомов углерода, цифра после двоеточия - число двойных связей; h – гидрокси-кислота; a,i - в начале означает разветвление; cyc - циклопропановая кислота. Например, ha17 - 3-гидрокси-антеизо-гептадекановая кислота.

**- имеется в виду 3-гидрокси-кислоты, если не указано положение гидроксила

ГХ-МС-анализу присущи:

- **широкий диагностический спектр**: определение маркеров десятков микроорганизмов одновременно в одном анализе;
- **универсальность**: определение разных групп микроорганизмов: бактерий, грибов, вирусов;
- **экспрессность**: время одного анализа не более 2,5 часов
- **высокая чувствительность:** 0.01 нг/мл маркера
- **селективность**: определение микроорганизма до вида - при наличии видового маркера
- **независимость** от оснащения микробиологической лаборатории и **возможность** прямого анализа клинических образцов без высевания и подращивания;
- **экономичность**: метод не требует биологических и биохимических тестовых материалов, культуральных сред, ферментов, праймеров.

Для проведения экспресс-анализа маркеров микроорганизмов требуются: хромато-масспектрометр + программа расчета + база данных.

Показанием к применению ГХ-МС метода является определение общего микроэкологического статуса организма, микробиоценоза кишечника, его отклонений от гомеостаза, а также установление или уточнение этиологии инфекционно-воспалительного процесса при любых нозологических формах заболеваний в клинической практике. **Противопоказаний** к применению метода ГХ-МС **нет.**

2. Клинические материалы и средства измерений

Материалом для исследования больных с заболеваниями органов пищеварения служат кровь, слюна, желудочное и дуоденальное содержимое, биоптаты слизистой оболочки пищевода, желудка и кишечника, кал - в зависимости от конкретно решаемой задачи. Образцы биологической жидкости или ткани обрабатывают сразу или замораживают и хранят при - 5/ -18 ºС в случае, когда немедленный анализ невозможен. Допускается транспортировка проб при нормальной температуре в течение пяти часов. Допускается длительное хранение в высушенном виде при необходимости дальней транспортировки или пересылки пробы по почте (высушивать при температуре 70-85 ºС).

3. Подготовка пробы к хромато-масс-спектрометрическому анализу.

При подготовке пробы к хромато-масс-спектрометрическому анализу жидкие пробы высушивают с добавлением равного по объему количества метанола и подвергают кислому метанолизу в 1М HCl в метаноле. Метанолиз проводят в 0,4 мл реактива на 10 –15 мг сухого остатка (40 мкл цельной крови) в течение 1 часа при 80°С. На этой стадии происходит

освобождение жирных кислот и альдегидов из сложных липидов микроорганизмов и других клеток жидкости в виде метиловых эфиров и диметилацеталей. Эти компоненты экстрагируют гексаном (400 мкл) в течение 5 мин, гексановый экстракт высушивают, а сухой остаток обрабатывают 20 мкл N,O-бис(триметил-силил)-трифторацетамида в течение 15 мин при 80°С для получения триметилсилильных эфиров окси-кислот и стеролов. К реакционной смеси эфиров добавляют 80 мкл гексана и 1-2 мкл раствора вводят в инжектор ГХ-МС системы.

Кровь из пальца (или из вены), а также слюну или ликвор в количестве не менее 100 мкл отбирают в пробирку с гепарином или ЭДТА (цитрат не рекомендуется) и помещают в холодильник для хранения до момента анализа. Для анализа цельную кровь в количестве 40 мкл пипеткой переносят в виалу, емкостью 1,5 мл, с завинчивающейся крышкой с тефлонированной прокладкой, подсушивают (при снятой крышке) в термостате при 80°С с добавлением 40 мкл метанола для ускорения сушки. Ликвор или слюну для анализа берут в количестве 80 мкл и подсушивают с добавлением 80 мкл метанола. К загустевшей пробе приливают 400 мкл 1М HCl в метаноле, завинчивают плотно крышкой и подвергают кислому метанолизу при 80°С в течение одного часа. К охлажденной реакционной среде добавляют 300 нг стандарта (дейтерометиловый эфир тридекановой кислоты), растворенного в гексане. Затем проводят экстракцию двумя порциями по 200 мкл гексана, встряхнув смесь на вортексе и позволяя отстоятся в течение 5 мин при комнатной температуре. Экстракт переносят в чистую виалу, высушивают 7 мин при 80°С, и сухой остаток обрабатывают 20 мкл N,O-бис(триметилсилил)-трифторацетамида в течение 15 мин при 80°С при закрытой крышке. К реакционной смеси добавляют 80 мкл гексана и, при анализе с использованием автосемплера, переносят смесь в коническую вставку, которую помещают в ту же виалу, в которой проводили силилирование, и завинчивают ее плотно крышкой. В таком виде проба пригодна для анализа в течение недели, если она герметично закрыта и не происходит ее испарения. При ручном вводе пробы коническая вставка не нужна.

При анализе мочи пробу в центрифужной пробирке в количестве 5 мл выстаивают при 5 °С до выделения осадка (1 час и более). Осадок с минимальным захватом мочи переносят пипеткой в невысокий бюкс (тигель, химический стакан) и упаривают при температуре 80°С с добавлением такого же объема метанола. Если осадок не образуется, на анализ 2 мл мочи помещают в широкодонный сосуд (химический стакан или бюкс, можно тигель) добавляют 1 мл метанола и упаривают до вязко-жидкого или сухого состояния. Затем в сосуд, где проводили упаривание, вносят микропипеткой 0,6 мл 1,2 М HCl в метаноле и той же микропипеткой соскабливают осадок со дна сосуда. Переведя его во взвесь, переносят в виал и подвергают кислому метанолизу, согласно протоколу для крови.

Метанолиз биоптатов тканей (кишечник и другие слизистые оболочки - в количестве 4-8 мг, мышечная ткань – 40 мг), проводят в 0,4 мл 1М HCl в метаноле при 80°С в течение часа. Дальнейшие операции проводятся в той же последовательности, что и при приготовлении проб крови.

4. Проведение ГХ-МС анализа в режиме мультиионной масс-фрагментографии

Для проведения анализа смесь эфиров в количестве 2 мкл вводят в инжектор ГХ-МС системы вручную или посредством автоматической системы ввода проб (автосэмплера), которая обеспечивает воспроизводимость времен удерживания хроматографических пиков и повышает точность автоматической обработки данных. Хроматографическое разделение пробы осуществляют на капиллярной колонке с метилсиликоновой привитой фазой типа HP-5ms длиной 25 м и внутренним диаметром 0,25 мм, газ-носитель - гелий. Режим анализа - программированный, скорость нагрева термостата колонки 7 °С/мин в диапазоне 135 – 320 ºС. Выдержка при начальной температуре 1,5 мин. Температура испарителя – 250 °С, интерфейса – 250 – 300 °С. Масс-спектрометр - квадрупольный, с ионизацией электронами (70 эв) используют в режиме селективных ионов, или масс-фрагментографии (МФ), при периодическом сканировании до тридцати ионов в пяти интервалах времени. Интервалы и ионы выбирают таким образом, чтобы селективно детектировать маркеры определяемых видов микроорганизмов. В том числе используют сильный ион m/z = 87 в спектрах жирных кислот для детектирования малых количеств микробных кислот С12-С15, С17, С19. Ион 175 включают в каждый интервал, кроме пятого, для детектирования β-оксикислот, для которых он специфичен и интенсивен в спектре. Ионы 301, 315 и далее через 14 единиц массы включают в программу для подтверждения молекулярного иона оксикислот тридекановой, тетрадекановой и следующих в гомологическом ряду. Ион 312, как молекулярный, используют для выявления изомеров нонадекановой кислоты, важной для диагностики стафилококка и энтерококков. Подробности анализа приведены в Технологии (Оценка, 2009) и монографии (Осипов, 2010)

5. Интерпретация результатов.

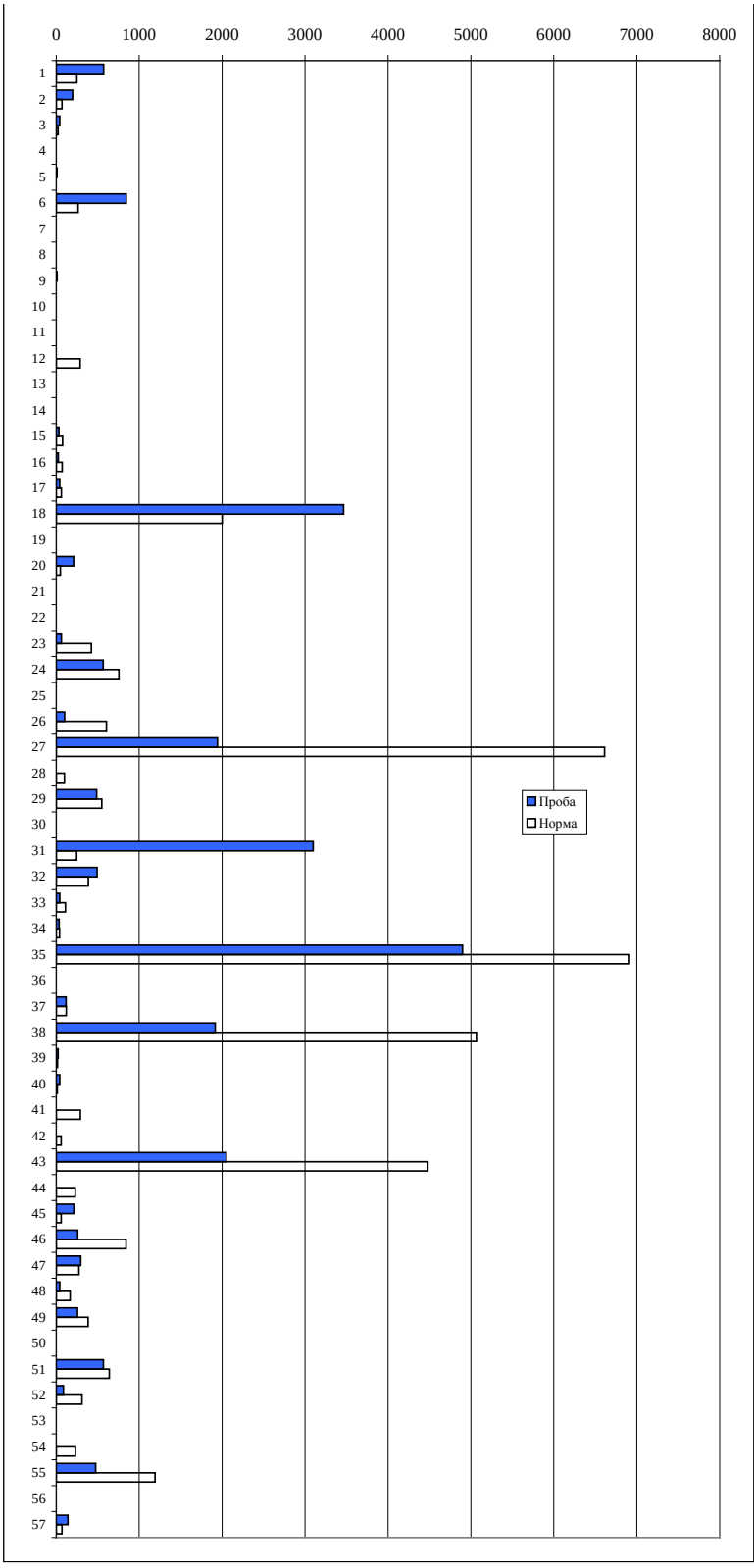
Клиническая процедура при использовании МСММ претерпевает существенные изменения, связанные с увеличением объема микробиологической информации по каждой пробе больного, сокращением времени анализа до трех часов, вместо недель и появлением в результатах непривычных для микробиолога и врача редко культивируемых микроорганизмов – большинства анаэробов, актинобактерий и других. Это требует принципиально новых

подходов в лечении больных на основании измененных представлений о микробной экологии человека в норме и патологии. «Врач должен учиться постоянно» (Л.Рошаль).

В период накопления нового клинического опыта, необходимого для разработки оперативных алгоритмов решения и их формализации в виде протокольных разрешительных документов (методик, пособий, медицинской технологии) клиническая процедура выглядит следующим образом:

- Определение биологических проб, подлежащих анализу в соответствии с диагнозом или симптомами заболевания, если диагноз отсутствует
- Проведение анализа по полному алгоритму МСММ
- Составление заключения *молекулярного микробиолога* (врача-интерпретатора) по особенностям результатов анализа
- Поиск информации в собственной базе данных или Интернет по специфике заболевания и связанных с ним микроорганизмов с измененной концентрацией и оценка их причастности к конкретной патологии
- Выбор антибиотика по имеющейся базе данных или поиск в Интернет, если необходимо подавление избыточного роста численности микроорганизма при воспалениях, сепсисе, инфекциях ткани и избыточном росте микробиоты кишечника или УГТ и прочего
- Выбор стимуляторов роста микробов, если их дефицит угрожает нарушением физиологического гомеостаза макроорганизма
- Определение других мер для восстановления гомеостатической нормы органа или микроэкологического статуса организма больного в целом, включающих имуностимуляторы, пробиотики, пребиотики, энтеросорбенты, микроэлементы и т.п., а также диэтические и процедурные назначения, нормализующие деятельность кишечника и других органов, содержащих слизистые оболочки или иные компартменты обитания симбиотной микробиоты
- Контроль за реакцией больного на принятую терапию – мониторинг и коррекция лечения

№	Микроорганизм	кл/г x10*5 Проба	Норма
1	Streptococcus (оральные)	570	249
2	Eubacterium lentum (группа А)	196	68
3	Bacillus cereus	43	23
4	Peptostreptococcus anaerobius	0	0
5	Str. pneumonia	11	0
6	Nocardia, 14:1d11	844	262
7	Peptostreptococcus anaerobius	0	0
8	Moraxella/Acinetobacter	0	0
9	Pseudomonas aeruginosa	10	0
10	Propionibacterium	0	0
11	Bacillus megaterium	0	0
12	Clostridium propionicum	0	288
13	Stenotrophomonas maltophilia	0	0
14	Bacteroides hypermegas	0	0
15	Актиномицеты	32	77
16	Pseudonocardia	26	70
17	Streptomyces	41	62
18	Clostridium ramosum	3465	2000
19	Fusobacterium/Haemophylus	0	0
20	Alcaligenes	209	48
21	Репер	0	0
22	Flavobacterium	0	0
23	Rhodococcus	62	423
24	Staphylococcus intermedius	565	756
25	Porphyromonas	0	0
26	Corineform CDC-group XX	100	605
27	Lactobacillus	1944	6613
28	Campylobacter mucosalis	0	99
29	Mycobacterium/Candida	486	549
30	сем. Enterobacteriaceae(E.coli и	0	0
31	Clostridium 12:0group*	3098	245
32	Cl.difficile	493	385
33	Actinomadura	42	110
34	Prevotella	35	38
35	Eubacterium/Cl. Coccoides	4899	6912
36	Bacteroides fragilis	0	0
37	Staphylococcus	119	120
38	Bifidobacterium	1917	5067
39	Helicobacter pylori, h18	23	14
40	Clostridium perfringens	42	12
41	Enterococcus	0	290
42	Eubacterium	0	59
43	Propionibacterium/Cl. subtermina	2050	4480
44	Streptococcus mutans (анаэробн	0	229
45	Herpes	212	59
46	Микр грибы, кампестерол	259	842
47	Nocardia asteroides	295	274
48	Цитомегаловирус	43	166
49	Микр грибы, ситостерол	255	384
50	Propionibacterium acnes	3	0
51	Ruminicoccus	569	640
52	Actinomycetes 10Me14	85	309
53	Blautia coccoides	0	0
54	Butyrivibrio/Cl. fimetarum	0	231
55	Actinomyces viscosus	475	1190
56	Propionibacterium jensenii	0	0
57	Цитомегаловирус-2	141	70
	Сумма	23520	34320



Плазмологен (по 16а)	20,23	50	мкг/мл
Эндотоксин (сумма)	1,17	0,5	наномоль/мл

Рис 1. Результаты исследования состава микробных маркеров в крови методом газовой хроматографии - масс-спектрометрии. Дерматит на фоне дисбактериоза кишечника в результате пищевого отравления

Доминирует группа клостридий Clostridium 12:0 (Clostridium perfringens, C. putrefacience, C. hystolyticum, C. Tetani). Уровень клинической значимости (выше нормы более чем в два раза) имеют маркеры Eubacterium lentum, стрептококков, нокардий, Pseudomonas aeruginosa, Alcaligenes и вируса герпеса при дефиците лактобацилл, бифидобактерий, группы Propionibacterium/Cl. subterminale. В соответствии с приведенным выше протоколом действий врач-интерпретатор (иначе – патолог) должен уделить внимание двум обстоятельствам: избыточному росту ряда микроорганизмов, отмеченных в заключении лаборанта (инфекция) и дефициту другой группы микроорганизмов. В целом в этом состоит нарушение микроэкологии организма, то есть – дисбактериоз без всякого негативного смысла этого понятия. Основным агентом инфекции выглядит группа Clostridium 12:0 как по численности (более чем в десять раз превышает норму), так и по токсигенной активности. Надо воздействовать антибиотиками. Из статей, найденных в сети интернет, или из настоящего руководства выясняют, что подходящими антибиотиками являются: metronidazole, chloramphenicol, imipenem, penicillin, erythromycin, ofloxacin (Am. J. Trop. Med. Hyg., 80(5), 2009, pp. 827–831; Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Apr. 1977, p. 695-697). Параллельно проводят восстановление миробиоценоза пробиотиками и другими факторами его нормализации (см. ниже – глава VI). Через три-пять дней повторяют анализ и корректируют лечение, при необходимости.

Другой вариант преставления результата анализа в сокращенном виде приведен на рисунке 2.

№	Микроорганизм	кл/гх10*5 Проба	Норма (ас
2	Eubacterium lentum	27	12
3	Bacillus cereus	13	0
6	Nocardia	171	19
12	Clostridium propionicum	26	0
17	Streptomyces	17	4
18	Clostridium ramosum	1238	255
26	Corinebacterium	94	16
27	Lactobacillus	1750	463
29	Candida	440	15
32	Cl.difficile	148	16
35	Eubacterium/ C.coccoides	1265	50
37	Staphylococcus	24	17
41	Enterococcus	62	21
43	P.freudenreichii/ C.subterminale	3058	186
44	Streptococcus mutans	152	208
45	Herpes	299	28
46	Микр грибы	80	20
48	Цитомегаловирус	75	7
51	Ruminicoccus	514	17
55	Actinomyces viscosus	245	86
	Сумма	9699	1820

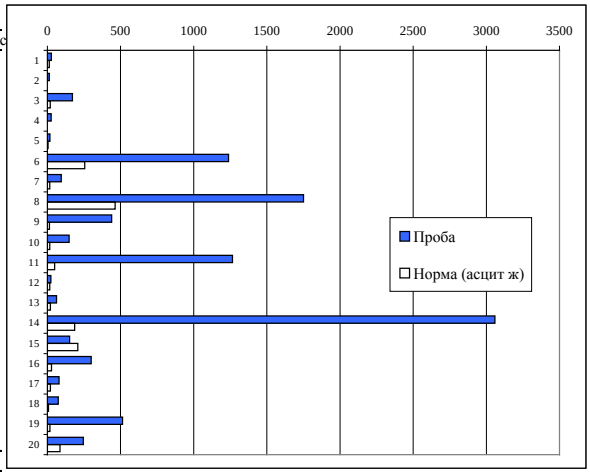


Рис 2. Результаты исследования состава микробных маркеров в пунктате кисты поджелудочной железы методом газовой хроматографии - масс-спектрометрии.

В этом примере доминируют клостридии группы Clostridium ramosum, лактобациллы, эубактерии, руминококки, актинобактерии Nocardia, дрожжи кандида и вирусы при избыточном росте других микроорганизмов (отмечены выделением). Как видно,это в

основном клостридиальная анаэробная инфекция. Подбирают лечение в соответствии с чувствительностью клостридий (глава VI).

Или тот же анализ в виде наглядной диаграммы позволяет наглядно вычленить доминирующие микроорганизмы (рис 3)

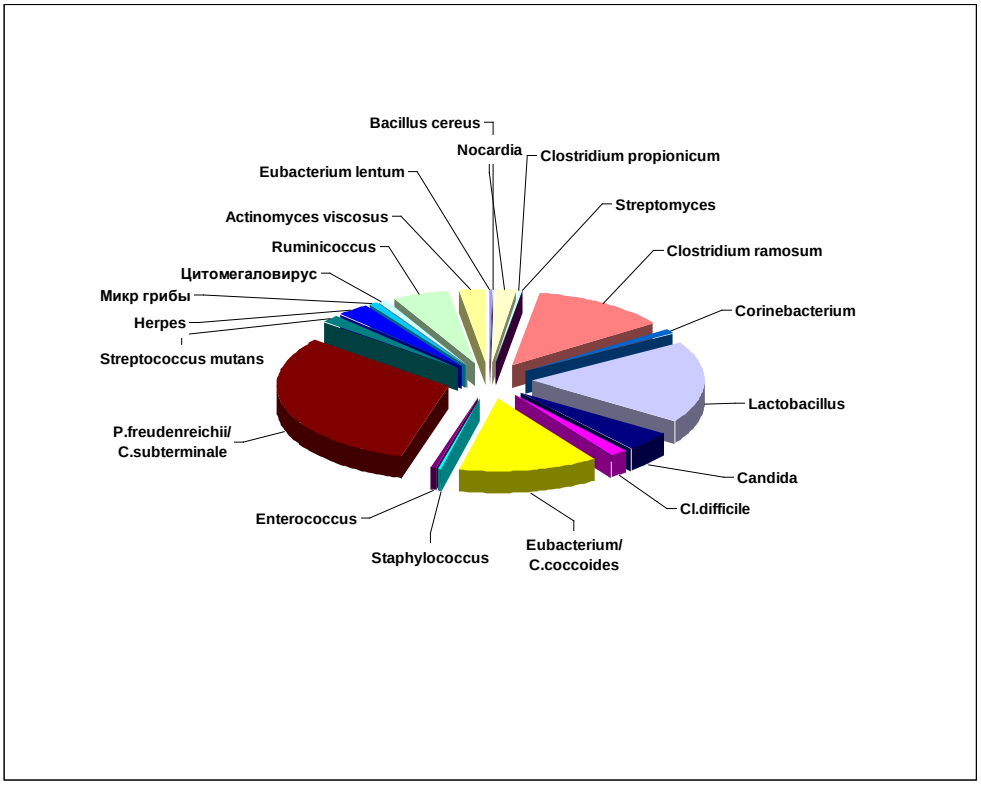


Рис 3. Результаты исследования состава микробных маркеров в пунктате кисты поджелудочной железы методом газовой хроматографии - масс-спектрометрии. Круговая диаграмма.

IV. Микробиота кишечника и фекалий по данным масс-спектрометрии микробрых маркеров

Методом МСММ расшифрован состав микроботы пристеночного мукозного слоя всех отделов кишечника, а также фекалий (Осипов, 2003). Данные по фекалиям оказались в полном количественном соответствии с литературными, что послужило основанием для верификации метода ГХ-МС в применении к другим объектам исследования (Табл 2) (Osipov, 2010). Они получены у практически здоровых людей разного пола и возраста. Как видно из таблицы, количественный состав микроорганизмов и их сумма резко различны. Вариации по сумме составляют порядок, а по отдельным микробам до двух порядков и более. Например, порядок по бифидобактериям, два порядка по лактобациллам, три порядка по пропионовым

бактериям, хеликобактеру и Clostridium ramosum. Результат еще раз свидетельствует о нестабильности состава фекалий и, следовательно, проблематичности его использования для оценки изменений микрофлоры кишечника: колебания в норме перекрывают патологические сдвиги. Сам факт существования этих микроорганизмов в составе фекалий известен, но из отдельных измерений в разных лабораториях, а также обобщений в руководствах. В этом свете таблица содержит подтверждение известных данных, но сразу многих в одном анализе и с большой точностью по сравнению с культуральным и, пожалуй, генетическим (FISH) методами.

Для подтверждения достоверности этих и последующих измерений методом ГХ-МС микробных маркеров приводим их сопоставление с известными количественными данными, полученными культурально-биохимическим и генетическим методами (табл. 2).

Таблица 2

Сопоставление данных анализа микробиоты фекалий генетическим, культурально-биохимическим и масс-спектрометрическим методами.

	Состав микробиоты фекалий взрослых людей, клеток/г мокрого веса				
	Масс-спектрометрия	Генетический метод, Harmsen, 2002	Культуральный метод		
			Бондаренко, 2003	Маянский (Schaechter)	Фирма Hoechst (сух.вес.)
Общая численность	0,6-5× 10^{11}	3,5× 10^{10}	10^{10}- 10^{11}	10^{10}- 10^{12}	2x10^{11}
Доля анаэробов, %	84-94	До 100	90-95	До 100	33-100
Eubacterium	10^{11}	7,1x10^{9}	10^{9} – 10^{10}	10^{9} – 10^{12}	3 x 10^{10}
Бактероиды	10^{10}	9,5x10^{9}	10^{9} - 10^{10}	10^{10} - 10^{12}	10^{11}
Клостридии	6 x 10^{10}	7,9x10^{9}	10^{5} - 10^{8}	10^{5} - 10^{11}	3 x 10^{10}
Бифидобактерии	10^{10}	1.7 x10^{9}	10^{9} - 10^{10}	10^{8} - 10^{12}	2 x 10^{8}

Полученная методом ГХ-МС общая численность микроорганизмов фекалий находится в пределах интервала значений 0,6-5× 10^{11} кл/г, что согласуется с известными литературными данными измерений генетическим и культурально-биохимическим методами. Совпадает с известными оценками и относительное количество анаэробов в них, которое по этим данным составляет 88%. Родовое распределение трудно сравнивать с литературными данными, так как в них приводится очень широкий диапазон значений, - в пределах 3-6 порядков. Тем не менее, совпадает оценка о приоритете рода Eubacterium, численность которых имеет порядок 10^{11} кл/г (10^{9} – 10^{12} по литературным данным), о количестве бактероидов 10^{10} кл/г (10^{10} - 10^{12} по известным данным), клостридий - 6 x 10^{10} кл/г (10^{5} - 10^{11} соответственно), бифидобактерий 10^{10} кл/г (10^{10} - 10^{12}), а также по энтерококкам, энтеробактериям, лактобациллам и стафилококкам. Этот результат позволяет утверждать что анализ микробиоты фекалий методом ГХ-МС по жирным кислотам клеточной стенки микрорганизмов дает достоверные

данные об их численности. Следовательно, можно считать так же достоверными приводимые здесь сведения о составе микроорганизмов в биоптатах кишечной стенки.

Результаты разных исследований микробиоты фекалий отводят бифидобактериям в их составе почти от 100% до 0,1%. Диапазон в три порядка вряд ли вызван межлабораторной воспроизводимостью - в каждом исследовании приводится серьезная статистика и добросовестная аналитическая процедура. Разницу следует, скорее, отнести к особенностям самого материала и точностью сопоставляемых методов количественных измерений. Не вдаваясь в детали, можно заключить, что эффект доминирования бифидобактерий создает рутинная практика анализа только бифидобактерий, иногда лактобацилл, еще реже - клостридий и бактероидов в сопоставлении с долей условно-патогенной микрофлоры при исследованиях дисбактериозов. Как видно из поля зрения микробиолога при этом выпадают эубактерии, бактероиды и клостридии, которых в фекалиях по современным оценкам по крайней мере в несколько раз больше, чем бифидобактерий. Это заблуждение выглядит естественным, если вспомнить, что в рамках общей микробиологии принято считать, что в микробном сообществе в среднем культивируемыми являются не более 20% микроорганизмов любого местообитания. Что касается фекалий, то по оценкам молекулярно-генетическими методами так же оказывается, что определение 60-80% их микробиоценоза не доступно для культуральных методов. Данные масс-спектрометрии коррелируют с генетическими (в рамках сопоставимости микробиологических количественных измерений) и одинаково показывают, что эубактерий, бактероидов и клостридий вместе и по отдельности на порядок больше, чем бифидобактерий.

Одновременное исследование крови тех же пациентов, а также доноров показало соответствие состава минорных ЖК, альдегидов и стеролов в тонкой кишке и в крови. Показана количественная адекватность изменений их концентраций в этих органах при дисбактериозе, ассоциированном с синдромом раздраженной тонкой кишки с преобладанием поносов, болезнью Крона и псориазом (Осипов, 2003). Это означает возможность неинвазивной оценки изменений микробиоты кишечника по данным анализа крови методом ГХ-МС микробных маркеров.

Метод около пятнадцати лет проходил апробацию медицинских учреждениях г. Москвы. В 2010 году Росздравнадзором разрешено его применение в качестве новой медицинской технологии «Оценки микроэкологического статуса человека методом хромато-масс-спектрометрии» на территории Российской Федерации (Разрешение ФС 2010/038 от 24.02.2010).

Концентрация микробных маркеров, следовательно, и соответствующих им микроорганизмов пристеночного слоя кишечника (табл 3, Рис 4 – круговая диаграмма

таксонов, тощая кишка) в биоптатах кишечной стенки здоровых людей по порядку величины оказалась одинаковой для тощей, подвздошной и толстой кишок $(0,6 - 1) \times 10^{11}$ кл/г, но существенно меньшей по сравнению с фекалиями ($2,7\times 10^{11}$ кл/г). Общая удельная численность микроорганизмов в пристеночном слое ободочной кишки в два с половиной раза меньше, чем в фекалиях, но доля анаэробов также составляет 89%. Однако родовой состав внутри группы анаэробов иной, чем в фекалиях. На стенке больше втрое концентрация бифидобактерий, но меньше лактобацилл и эубактерий. Причем у последних изменен и видовой состав по сравнению с фекальным. Измерения некультуральными методами показали, что бифидобактерии составляют менее 3% кишечной микробиоты (Wilson, 2008), что совпадает с нашими измерениями методом МСММ, согласно которым максимум содержания бифидобактерий в фекалиях человека составляет 2,5% (Osipov, 2009).

Таблица 3.

Состав микроорганизмов стенки кишечника и в фекалиях по группам

Группы и таксоны микроорганизмов	Численность, кл/г, $\times 10^6$			
	Тощая	Подвздошная	Ободочная	Фекалии
Кокки, бациллы, коринебактерии				
Streptococcus (Lactococcus)	261	253	1170	1691
Bacillus cereus	0	51	157	284
Bacillus megaterium	90	0	0	0
Corineform(Listeria) a17	1398	439	713	65
Staphylococcus	616	410	490	121
Streptococcus (оральные)	1642	127	2	641
Сумма	4006	1281	2533	2803
Анаэробы				
Eubacterium lentum	98	675	670	4334
Clostridium hystolyticum	692	467	849	388
Peptostreptococcus anaerobius	487	1170	515	15229
Clostridium propionicum	1237	150	0	13942
Bacteroides hypermegas	0	0	0	163
Clostridium ramosum	3892	1942	118	0
Fusobacterium	0	0	0	129
Porphyromonas	0	0	0	39
Lactobacillus	17355	17190	16231	30510
Eubacterium moniliforme	0	0	0	892
Cl.difficile	1769	861	1055	684
Prevotella	620	583	345	7557
Eubacterium (основная группа)	6832	11497	24457	12026
Bacteroides fragilis	0	63	43	1340
Bifidobacterium	5249	7108	31886	10723
Clostridium perfringens	224	50	43	44698
Eubacterium	27	1548	3549	93218
Propionibacterium (P.freudenreichii)	12777	1057	13086	3648
Propionibacterium acnes	0	0	359	388
Ruminicoccus	804	800	1364	30

E.lentum 7741	93	56	0	282
Bacteroides ruminicola	0	7	9	2769
Eubacterium spp.	365	265	5650	9725
Propionibacterium	0	0	0	698
Сумма	52520	44648	100138	238219

Аэробные актиномицеты				
Nocardia, 14:1d11	1595	0	1136	7
Актиномицеты	797	289	105	0
Pseudonocardia	215	7	85	34
Streptomyces	493	392	329	1522
Rhodococcus	1588	792	698	127
Mycobacterium/Candida	3025	3184	3257	0
Actinomadura	151	0	12	0
Nocardia asteroides	1782	0	609	108
Actinomycetes 10Me14	3652	3196	2328	92
Сумма	13297	7859	8558	1891

Грам (-) палочки				
Acinetobacter	0	0	0	125
Pseudomonas aeruginosa	0	0	0	42
Stenotrophomonas maltophilia	0	0	0	24
Сумма	0	0	0	191

Энтеробактерии и энтерококки				
Klebsiella /Sphingomonas 2h14	146	261	190	84
Campylobacter mucosalis	0	0	0	18
E.coli	20	21	25	0
Helicobacter pylory, h18	529	141	92	2134
Enterococcus	783	484	1252	669
Enterococcus faecalis	0	0	530	4649
Сумма	1478	907	2089	7554

Микроскопические грибы				
Микр грибы (кампестерол)	216	375	112	1430
Микр грибы (ситостерол)	197	422	56	888
Микр грибы (эргостерол)	0	0	0	286
Сумма	413	797	168	2604

Вирусы				
Herpes	216	113	203	0
Цитомегаловирус	919	31	26	8
Сумма	1135	144	230	8
Общая сумма	**72849**	**56223**	**112637**	**268462**

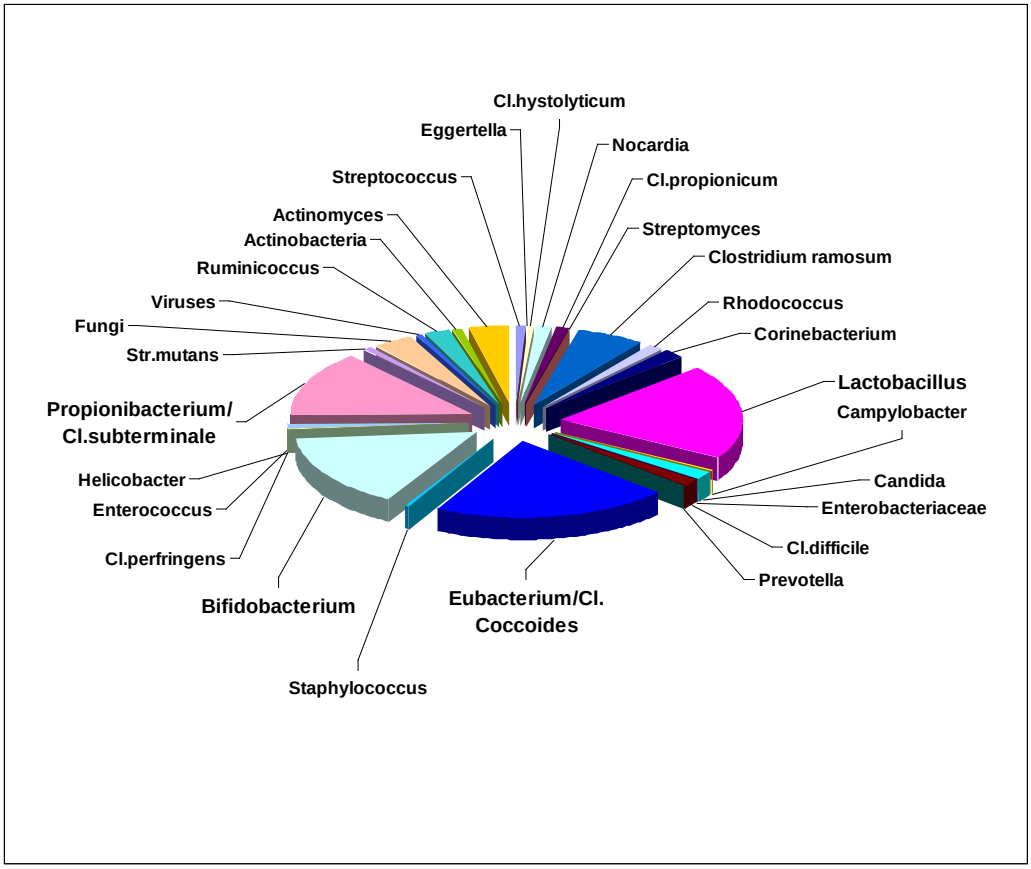


Рис 4. Основные микроорганизмы пристеночной микробиоты тощей кишки здорового человека. Измерено методом масс-спектрометрии микробных маркеров.

Численность *C. perfringens* на три порядка меньше в пристеночном слое как ободочной, так и подвздошной кишки, чем в фекалиях, но снова увеличивается в тощей. Это означает, что фекалии являются основным местообитанием этих бактерий, а также *C. propionicum*. Другие клостридии, *C. hystolyticum и C. difficile* сохраняют порядок величины по отделам кишечника и в фекалиях (около 10^3), а *C.ramosum* не обнаруживается в фекалиях, но ее численность растет от 10^8 в ободочной до 10^9 в тощей кишке. Следующей по численности группой в фекалиях являются факультативные анаэробы – энтеробактерии и энтерококки, в основном, за счет *E. faecalis,* который не обнаруживается в подвздошной и тощей кишках, тогда как прочие энтерококки, хеликобактер и клебсиеллы равномерно заселяют кишечник и фекалии. *E.coli* и другие бактерии сем. *Enterobacteriaceae* в норме обнаруживаются методом ГХ-МС только на кишечной стенке, а *Campylobacter mucosalis* – только в фекалиях.

Существенную долю (17%, $1{,}3 \times 10^{10}$ кл/г) микробиоты тощей кишки (в фекалиях – на порядок меньше) составляют аэробные актиномицеты (актинобактерии – по современной классификации микроорганизмов). В специализированных лабораториях подтверждено их наличие на слизистых оболочках и коже человека и животных, а также их участие в воспалительных процессах. Они не доступны рутинному клиническому контролю, однако, благодаря наличию уникальных молекулярных маркеров, могут быть обнаружены и

количественно измерены методом масс-спектрометрии. Далее по численности следуют аэробные кокки (стафилококки, стрептококки, энтерококки и коринеформные бактерии) – около 5% в тощей кишке и 1% в фекалиях.

В результате удалось измерить концентрацию микробных компонентов непосредственно в месте обитания, где присутствуют сами клетки микробов кишечной стенки. Поэтому можно делать прямые сопоставления между концентрацией маркеров и числом микробных клеток в условиях отсутствия пищевой липидной компоненты, поскольку биоптаты получали натощак. Такая логика убеждает в том, что измерена ведущая микробиота кишечной стенки. Ведущая в количественном отношении, так как оказалось, что при наличии биоптата весом 4 мг можно детектировать микроорганизмы начиная с концентрации 10^4 - 10^5 кл/г, поэтому, значительная часть минорных микроорганизмов кишечника осталась вне поля зрения. Как оказалось, общая численность микроорганизмов кишечной стенки в норме имеет величину в пределах $(0,5\text{-}1,3)\times10^{11}$ кл/г в зависимости от отдела кишечника.

Плотность заселения стенки кишечника в дистальном направлении меняется мало: в подвздошной кишке она в два раза меньше, а в толстой в полтора раза больше, чем в тощей. Пристеночная микробиота оказалась существенно более концентрированной, чем просветная, которая в тонкой кишке на шесть порядков ниже по численности (до 10^5 кл/мл), в подвздошной кишке – на порядок выше, а в ободочной кишке соответствует таковой в ее содержимом. Видовой состав микроорганизмов соответствует известным представлениям о компонентах кишечной микробиоты, в особенности – микроорганизмов фекалий (Hopkins, 2001). Однако сходство ограничивается категориями общего характера: качественного состава и приоритетного (рангового) содержания основных элементов кишечного микробиоценоза. Действительно, в толстом кишечнике и фекалиях существенно больше анаэробов.

Основную долю (от 70% в тощей кишке до 88% в фекалиях) микроорганизмов во всех отделах кишечника составляют анаэробы. Второе место по численности в тощей кишке занимают актинобактерии (кроме бифидо- и пропионобактерий) – 17% (в фекалиях их всего 0,7 %). Аэробные кокки (стафилококки, стрептококки, энтерококки и коринеформные бактерии) – составляют 5% колонизации тонкого кишечника по сравнению с 0,7 % в фекалиях. Доля энтеробактерий и энтерококков по отделам кишечника и в фекалиях близка к 2%.

Следует отметить филогенетическое родство эубактерий и клостридий. В определителе Берджи 9-го издания прямо сказано, что род *Eubacterium* создан для удобства, чтобы поместить в него слабо спорообразующие клостридии. Если отметить еще гетерогенность обеих родов, то можно видеть, что ***кишечная микробиота представляет собой доминирующий континуум штаммов и видов родов Clostridium и Eubacterium в их современном написании при равновеликом суммарном количестве бифидобактерий,***

пропионобактерий и лактобацилл. На долю остального биоразнообразия микроорганизмов кишечника (по данным масс-спектрометрии) приходится до 10% в фекалиях и пристеночном слое ободочной кишки и до 30% в тощей кишке.

Обнаруженный в результате систематических исследований гомеостаз микробных маркеров в крови (Белобородова, 1999; Beloborodova, 2000) и адекватность его профиля составу кишечной микробиоты здорового человека обеспечил уникальную возможность мониторировать состояние микробиоты кишечника неинвазивным экспрессным методом – по анализу крови. Поскольку в кровь попадают также липидные компоненты отмирающих микроорганизмов из других органов, то его можно считать экспрессным методом определения микроэкологического статуса высших организмов.

V. Микробиота кишечника при заболеваниях органов пищеварения и ее нозологическая специфичность.

1. Реконструкция микробиоты по данным состава микробных маркеров в крови при хроническом гастродуодените у детей.

Количественное показатели микрофлоры щеточной каймы 20 детей с хроническим гастродуоденитом, 20 детей с хроническим гастродуоденитом и сопутствующим аутоимунным тиреоидитом и 20 здоровых детей представлены на рис.5. Значения приведены относительно нормальных значений для микробов с Streptococcus sp по Actinomyces viscosus (то есть значение на шкале означает во сколько раз превышено среднее значение) для микробов с Peptostreptococcus anaerobis 1 по Butifibrio/Cl.firnetarium шкала значений от 1 до 5 соответствует шкале значений от 0 единиц (нормы) до максимального значения для данного микроба.

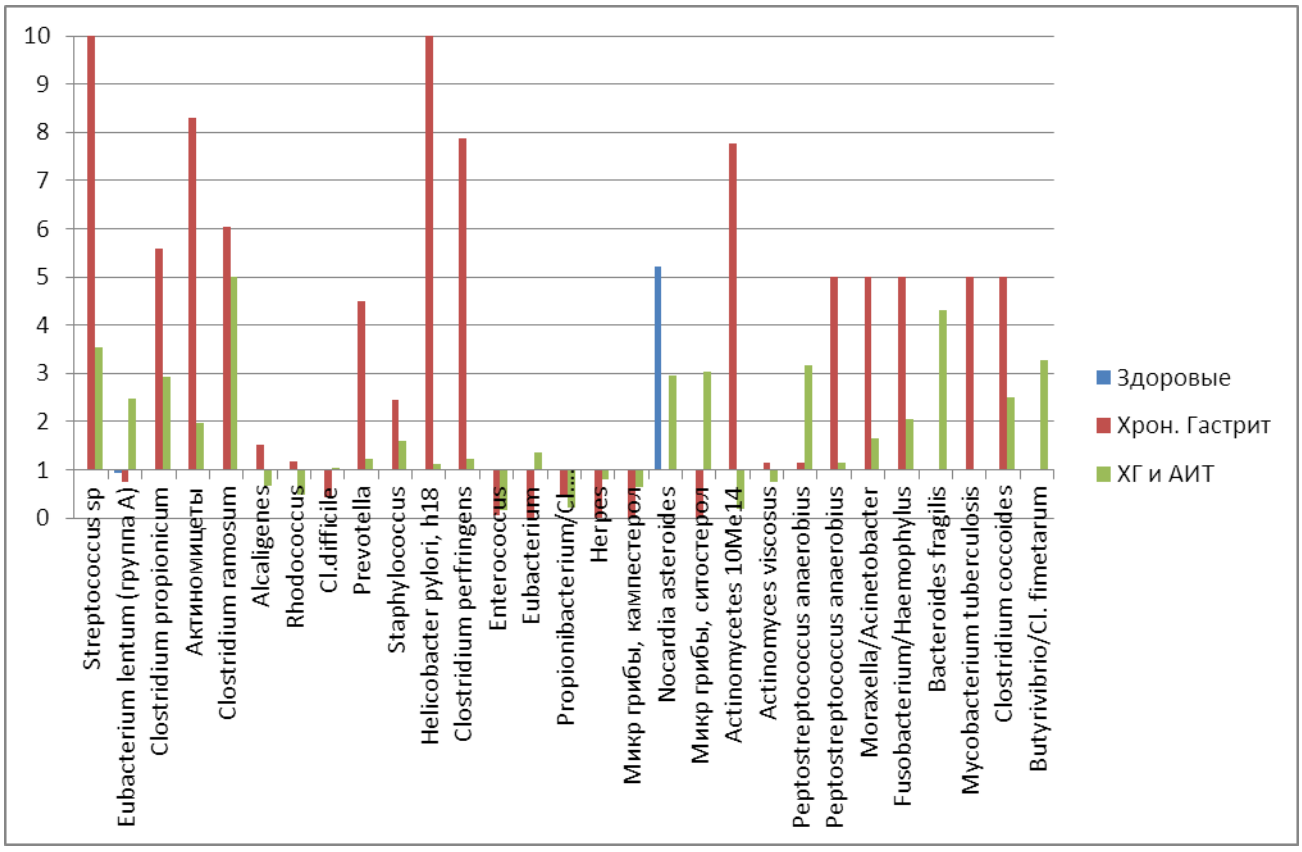


Рисунок 5. Состояние микрофлоры щеточной каймы у детей хроническим гастритом (ХГ) и сопутствующим аутоиммунным тиреоидитом (АИТ) по данным хромато-масс-спектрометрии микробных маркеров крови.

Как следует из рисунка 5 состояние пристеночной микрофлоры у детей с ХГ и АИТ, с ХГ без сопутствующего АИТ и здоровых детей существенно различаются. В таблицах 4 и 5 представлены данные о дефиците нормофлоры и избыточном росте кишечной микробиоты при ХГ в сравнении с нормой (кл/гх 10^5). Данные представлены в количестве клеток, эквивалентных концентрации маркеров, на мл крови. Их сумма представляет собой сумму клеток микроорганизмов, информация о которых дошла до крови – это $3.3x10^9$ кл/мл (для нормы) , то есть на порядок меньше, чем в мукозном слое тонкой кишки ($7.6x10^{10}$ кл/г). Если считать, как это принято, что в организме человека обитает 10^{14} микробов, а объем крови взрослого человека составляет 5л, то в нем содержится информация о 5000 х $3.3x10^9$ кл/мл= $1.6x10^{13}$ микробов. Информацию о порядке величины мы теряем по сравнению с измерениями микробиоты непосредственно в кишечной стенке за счет ухода части отмерших микробов в фекалии и утилизации части микробных жирных кислот для обновления клеток организма – хозяина. По выработанному ранее статистическому критерию [Beloborodova, 2010] отклонения от нормы приобретают клиническую значимость, когда численность микроорганизмов изменяется вдвое по сравнению с нормой.

Табл.4 Дефицит кишечной микробиоты при ХГ в сравнении с нормой (кл/гх 10^5)

Группа	Здоровые	Хронический гастрит
	n=20	n=20
Peptostreptococcus anaerobius	1330,7±241,9	44,8±44,8**
Cl.difficile	374,2±35,8	161,5±20,0*
Bacteroides fragilis	6,5±4,9	0,0±0,0*
Enterococcus	42,3±15,0	13,0±9,4*
Eubacterium	105,66±46,07	0,0±0,0**
Herpes	67,1±14,0	0,0±0,0*
Микр грибы, кампестерол	530,3±74,3	0,0±0,0**
Микр грибы, ситостерол	1097,5±111,3	0,0±0,0**
Butyrivibrio/Cl. Fimetarum	47,3±19,7	0,0±0,0*
Nocardia asteroides	1426,9±174,5	813,2±140,5*

Примечание: * — p < 0,05 **— p <0,01

Табл.5 Избыточный рост кишечной микробиоты при ХГ в сравнении с нормой (кл/гх 10^5)

Группа	Здоровые	Хронический гастрит
	n=20	n=20
Streptococcus sp	1195,3±272,2	3969±570*
Peptostreptococcus anaerobius	72,0±38,1	492,0±64,9**
Moraxella/Acinetobacter	1,2±1,2	19,3±3,8*
Актиномицеты	263,4±61,0	639,3±66,8*
Fusobacterium/Haemophylus	0,3±0,3	22,3±1,1*
Alcaligenes	29,0±5,3	73,0±8,2*
Rhodococcus	205,6±28,1	491,2±44,3*
Prevotella	54,7±20,1	171,2±10,9**
Staphylococcus	172,9±17,8	295,4±18,0*
Helicobacter pylori, h18	19,7±10,5	338,5±16,7**
Propionibacterium/Cl. Subt.	706,2±73,0	1915±252**
Mycobacterium tuberculosis	0,0±0,0	200,7±47,3**
Actinomycetes 10Me14	1,0±1,0	2398±198**
Clostridium coccoides	94,0±13,9	215,3±14,4**
Clostridium perfringens	17,11±1,95	94,4±7,2*

Примечание: * — p < 0,05 **— p <0,01

Общие изменения микроэкологического статуса организма у пациентов с ХГ и АИТ при сравнении с группой пациентов с ХГ без сопутствующих заболеваний ЩЖ были связаны с избыточным ростом эубактерий (*E.lentum*), клостридий (*Cl.difficile, Clostridium perfringens, Cl. Fimetarum*), бактероидов, энтерококков, герпеса, микробных грибов (кампестерол, ситостерол) при дефиците оральных стрептококков, клостридий (*Cl. Coccoides*), актиномицет, фузобактерий, *Alcaligenes, Rhodococcus, Prevotella, Staphylococcus*, пропионобактерий, *Helicobacter pylori* и *Mycobacterium tuberculosis* ($p<0,05$).

Табл.6 Избыточный рост кишечной микробиоты при ХГ и АИТ (кл/гх 10^5)

Группа	Здоровые	Хронический гастрит	Хронический гастрит и заболевания щитовидной железы
	n=20	n=20	n=20
Eubacterium lentum	63,4±20,5*	50,0±25,6*	168,6±37,2
Peptostreptococcus anaerobius	1330,7±241,9	44,8±44,8**	722,4±139,8
Cl.difficile	374,2±35,8	161,5±20,0**	398,2±69,5
Bacteroides fragilis	6,5±4,9	0,0±0,0**	5,4±1,9
Enterococcus	42,3±15,0	13,0±9,4**	47,1±12,5
Eubacterium	105,66±46,07	0,0±0,0**	80,0±18,66
Herpes	67,1±14,0	0,0±0,0**	47,9±18,7
Микр грибы, кампестерол	530,3±74,3	0,0±0,0**	529,4±89,4
Микр грибы, ситостерол	1097,5±111,3	0,0±0,0**	1162,3±221,3
Butyrivibrio/Cl. Fimetarum	47,3±19,7	0,0±0,0*	26,9±12,2

Примечание: * — $p < 0,05$ **— $p <0,01$

Табл.7 Дефицит кишечной микробиоты при ХГ и АИТ (кл/гх 10^5)

Группа	Здоровые	Хронический гастрит	Хронический гастрит и заболевания щитовидной железы
	n=20	n=20	n=20
Streptococcus sp	1195,3±272,2	3969±570**	881,3±120,6
Peptostreptococcus anaerobius	72,0±38,1	492,0±64,9**	19,4±19,4
Moraxella/Acinetobacter	1,2±1,2	19,3±3,8*	3,2±2,4

Актиномицеты	263,4±61,0	639,3±66,8**	151,1±19,3
Fusobacterium/Haemophylus	0,3±0,3	22,3±1,1*	5,8±5,4
Alcaligenes	29,0±5,3	73,0±8,2*	31,8±7,5
Rhodococcus	205,6±28,1	491,2±44,3**	208,8±28,8
Prevotella	54,7±20,1	171,2±10,9**	46,9±8,6
Staphylococcus	172,9±17,8	295,4±18,0*	191,0±36,2
Helicobacter pylori, h18	19,7±10,5	338,5±16,7**	15,8±4,1
Propionibacterium/Cl. Subt.	706,2±73,0	1915±252**	964,1±176,2
Mycobacterium tuberculosis	0,0±0,0	200,7±47,3**	0,0±0,0
Actinomycetes 10Me14	1,0±1,0	2398±198**	55,4±53,0
Clostridium coccoides	94,0±13,9	215,3±14,4**	80,7±9,1
Actinomyces viscosus	1137,8±134,3	1371,6±276,4*	873,6±132,2
Nocardia asteroides	1426,9±174,5*	813,2±140,5	810,8±154,5
Clostridium perfringens	17,11±1,95	94,4±7,2*	14,66±3,15

Примечание: * — $p < 0,05$ **— $p < 0,01$

Обращает внимание тот факт, что при ХГ и АИТ высокая концентрация клостридий (*Cl.difficile, Clostridium perfringens, Cl. Fimetarum*), бактероидов, энтерококков, герпеса, микробных грибов (кампестерол, ситостерол) не имела достоверных различий с группой здоровых детей ($p<0,05$).

В тоже время, концентрация оральных стрептококков, клостридий (*Cl. Coccoides*), актиномицет, фузобактерий, *Alcaligenes, Rhodococcus, Prevotella, Staphylococcus*, пропионобактерий, *Helicobacter pylori* и *Mycobacterium tuberculosis* была достоверно снижена у пациентов с ХГ и АИТ и соответствовала группе здоровых пациентов ($p<0,05$).

Единственным возбудителем, который достоверно больше встречался в группе пациентов с ХГ и АИТ как по сравнению с группой пациентов с ХГ, так и по сравнению с группой здоровых детей- *Eubacterium lentum* ($p<0,05$).

Общая микробная нагрузка была достоверно выше в группе ХГ без сопутствующих заболеваний ЩЖ при сопоставлении с группой ХГ и АИТ. Между группами здоровых детей и группой ХГ и АИТ по этому параметру достоверных различий не отмечалось ($p<0,05$).

Выявлена корреляционная взаимосвязь между концентрацией *Eubacterium lentum* и уровнем гормонов щитовидной железы : Т4-$r= -0,683$, $p<0,05$, ТТГ-$r=0,734$, $p<0,05$ и объемом щитовидной железы по результатам УЗИ-$r= -0,658$, $p<0,05$. Отмечается также корреляционная взаимосвязь между концентрацией *Eubacterium lentum* и степенью фиброза антрального отдела желудка $–r=-0,52$, $p<0,05$ при гистологическом исследовании биоптатов.

В доступной литературе сведений о роли *Eubacterium lentum* в генезе аутоиммунных заболеваний ЩЖ нам не встречалось. Однако наше исследование показывает, что *Eubacterium lentum* следует рассматривать как возможный триггерный агент, запускающий аутоиммунные процессы у больных с хроническим гастритом и сопутствующим АИТ. Также полученные данные свидетельствуют о нозоспецефичности кишечной микрофлоры при ХГ и влиянии на нее коморбидной патологии - АИТ.

2. Нозологическая специфичность дисбиоза при функциональных заболеваниях кишечника.

Специфичность изменения кишечной микробиоты при функциональных заболеваниях кишеника подтверждает исследование, проведенное у больных с синдромом раздраженной кишки. (рис 6).

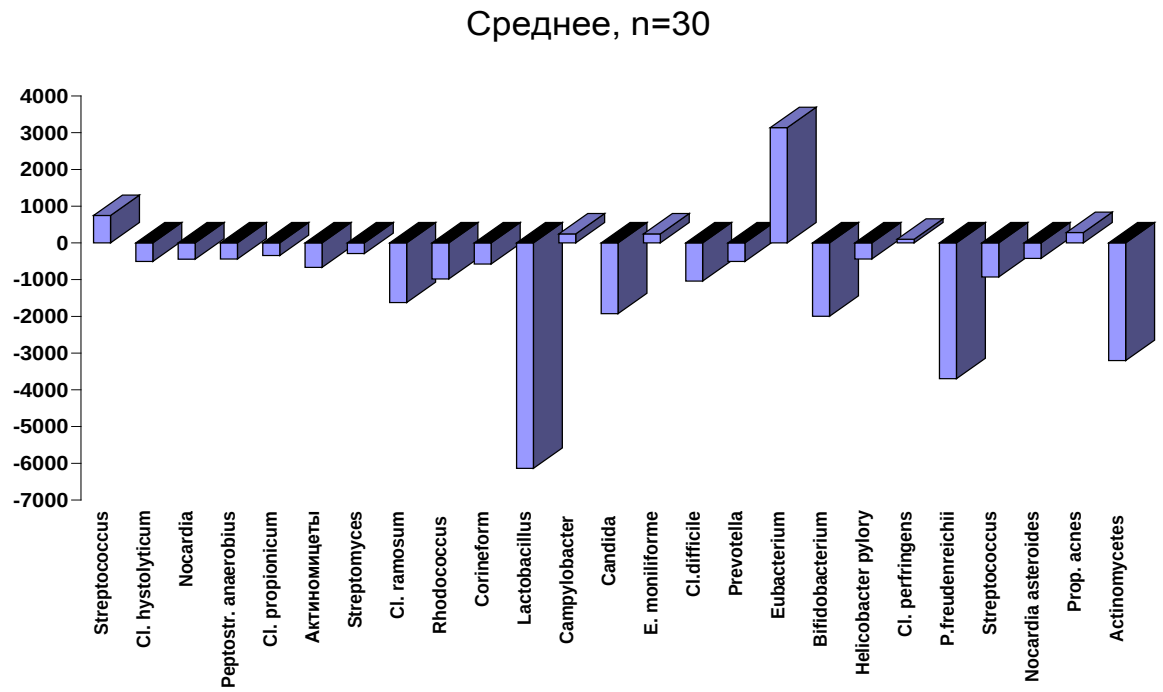


Рис 6. СРК. При синдроме раздраженного кишечника наблюдается тотальный дефицит кишечной микробиоты до семикратного снижения общей численности микроорганизмов при избыточном росте эубактерий и стрептококков.

При СРК наблюдается тотальный дефицит кишечной микробиоты до семикратного снижения общей численности микроорганизмов, сравнимый только с состоянием микробиоты после тяжелых травм или при сепсисе (Федосова, 2010). Это происходит преимущественно за счет уменьшения численности лактобацилл, бифидобактерий, основной группы эубактерий и пропионобактерий при избыточном росте других эубактерий и стрептококков. Кроме того, растет численность анаэробов *Bacteroides fragilis, Porphyromonas, Propinobacterium acnes*, при периодическом избытке энтеробактерий, клостридий группы *C. ramosum* и *Eggertella lenta,* а

также *Campylobacter mucosalis*, энтерококков, псевдомонад, *Acinetobacter*, бацилл и стрептококков. Эта группа микробов, вероятно, является источником токсинов, поддерживающих заболевание при дефиците противодействия со стороны основных представителей нормальной микробиоты.

Особенностями пристеночной микробиоты тонкой кишки у детей раннего возраста при функциональных запорах являлось снижение титра таких представителей, как Lactobacillus (6613±210 кл/г×10^5, и 2249±98 кл/г×10^5, p<0,05), Eubacterium/Cl. Coccoides (6912±214 кл/г×10^5, и 2622±94 кл/г×10^5, p<0,05), Bifidobacterium (5067±182 кл/г×10^5, и 1742 ±65 кл/г×10^5, p<0,05), Enterococcus (290±42кл/г×10^5, и 22 ±9 кл/г×10^5, p<0,05), Propionibacterium/Cl. Subterminale (4480±164 кл/г×10^5, и 766 ±48 кл/г×10^5, p<0,05), Actinomyces viscosus (1190±84 кл/г×10^5, и 334 ±27 кл/г×10^5, p<0,05) [23]. Результаты представлены на рис. 7.

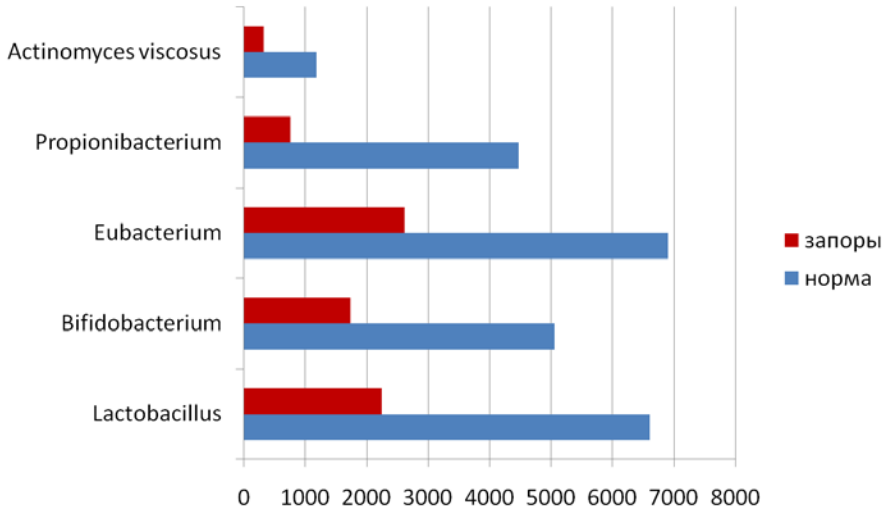


Рис.7.Снижение титра представителей нормальной пристеночной микробиоты тонкой кишки у детей раннего возраста при запорах.

По оси Х- число клеток/г×10^5

При этом отмечено увеличение числа таких бактерий, как Streptococcus sp (249±24 кл/г×10^5, и 1750 ±89 кл/г×10^5, p<0,05), Bacillus cereus (23±3,4 кл/г×10^5, и 593 ±26 кл/г×10^5, p<0,05), Peptostreptococcus anaerobius (0кл/г×10^5, и 231 ±21 кл/г×10^5, p<0,05), Clostridium hystolyticum (95±8 кл/г×10^5, и 1383±67 кл/г×10^5, p<0,05), Lactococcus (262±34 кл/г×10^5, и 1022 ±77 кл/г×10^5, p<0,05), Актиномицет (77±8 кл/г×10^5, и 470 ±26 кл/г×10^5, p<0,05), Clostridium ramosum (2000±86 кл/г×10^5, и 14710 ±328 кл/г×10^5, p<0,05), представителей семейства Enterobacteriaceae (0кл/г×10^5, и 254 ±21 кл/г×10^5, p<0,05). Значительно чаще, по сравнению с нормой, регистрировались маркеры герпетических инфекций: простого герпеса (59±4 кл/г×10^5, и 2217 ±97 кл/г×10^5, p<0,05) и цитомегаловируса (166±8 кл/г×10^5, и 20965 ±274 кл/г×10^5, p<0,05) [23]. Результаты представлены на рис. 8.

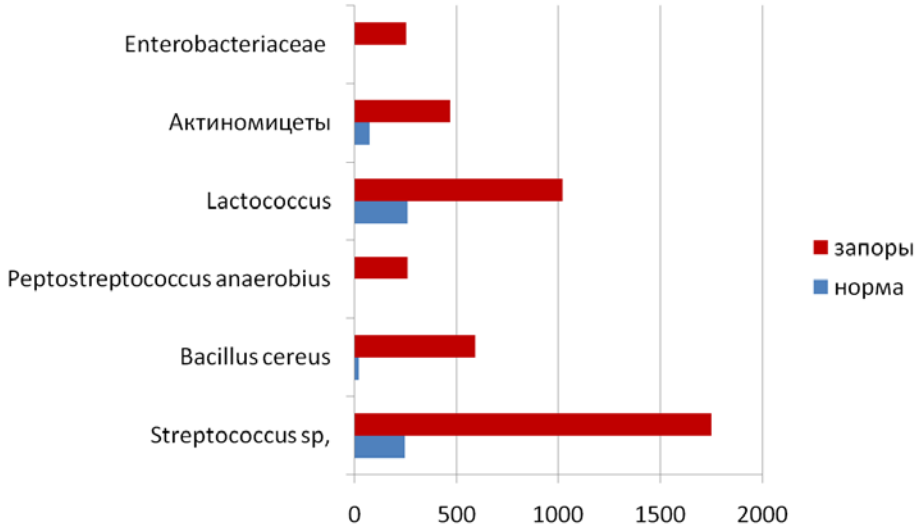


Рис 8. Повышение титра некоторых бактерий в пристеночной микробиоте тонкой кишки у детей раннего возраста при запорах
По оси Х- число клеток/г×10^5

3. Нозологическая специфичность дисбиоза при лямблиозе у детей.

Изучение пристеночной микробиоты выявило при лямблиозе (второй показатель) снижение, по сравнению с нормой, (первый показатель) количества таких микроорганизмов. как *Streptococcus sp.* (249 кл/гх·10^5 и 72,4±16,1 кл/гх10^5, p<0,05), *Clostridium propionicum* (288 кл/гх10^5 и 62,6±8,6 кл/гх10^5, p<0,05), *Rhodococcus* (423 кл/гх10^5 и 150,8±7,3 кл/гх10^5, p<0,05), *Actinomadura* (110 кл/гх10^5 и 11,2±2,3 кл/гх10^5, p<0,05), *Enterococcus* (290 кл/гх10^5 и 76,6±9,8 кл/гх10^5, p<0,05), *Streptococcus/Ruminococcus* (640 кл/гх10^5 и 76,6±18,6 кл/гх10^5, p<0,05) и увеличение ,по сравнению с нормой, количества таких микроорганизмов, как *Eubacterium lentum* (68 кл/гх10^5 и 510,8±45,7 кл/гх10^5, p<0,05), *Bacillus cereus* (23 кл/гх10^5 и 176,4±11,2 кл/гх10^5, p<0,05), *Lactococcus* (262 кл/гх10^5 и 935±55,5 кл/гх10^5, p<0,05), *Streptomyces* (62 кл/гх10^5 и 191,6±14 кл/гх10^5, p<0,05), *Clostridium ramosum* (2000 кл/гх10^5 и 7083±343 кл/гх10^5, p<0,05), *Campylobacter mucosalis* (99 кл/гх10^5 и 1020,8±228 кл/гх10^5, p<0,05), семейство *Enterobacteriaceae* (0 кл/гх10^5 и 325±25 кл/гх10^5), *Staphlococcus* (120 кл/гх10^5 и 287,2±14,6 кл/гх10^5, p<0,05), *Helicobacter pylori,* h18 (14 кл/гх10^5 и 54,2±4,0 кл/гх10^5, p<0,05), вирусы семейства Herpes (59 кл/гх10^5 и 610,2±29,7 кл/гх10^5, p<0,05), Цитомегаловирус (166 кл/гх10^5 и 1242,8±277,8 кл/гх10^5, p<0,05), Микр грибы, ситостерол (384 кл/гх10^5 и 1822±99 кл/гх10^5, p<0,05), *Butyrivibrio/Cl. Fimetarum* (0кл/гх10^5 и 598,8±103,9 кл/гх10^5, p<0,05), *Propionibacterium jensenii* (0кл/гх10^5 и 1401,8±226,9 кл/гх10^5, p<0,05). Особенностью

микрофлоры щеточной каймы при лямблиозе явилось отсутствие значимых изменений в содержании бифидобактерий и лактобацилл при значительном повышении титра условно-патогенных бактерий, вирусов и грибов [Новикова, 2012].

4. Энтероколит и дисбиотические изменения в микроэкологическом статусе у детей

Исследовали состав микробных маркеров в крови детей с энтероколитом, госпитализированных в ДГКБ № 13 им Н.Ф. Филатова и проходящих лечение имуномодулятором кипфероном на фоне общей терапии (N=21). В качестве групп сравнения использовали данные анализа микроэкологического статуса детей с атопическим дерматитом (АТД) и взрослых с синдромом раздраженной тощей кишки (СРК) с преобладанием поносов. Изменения состава реконструированной микробиоты по данным микробных маркеров в крови проводили относительно средне-статистической нормы, которая в рамках метода гомеостатична у взрослых и детей от 1 года.

При ГХ-МС исследовании фракций ЖК, стеролов и ДМА в пробах крови пациентов найдено, что основными компонентами (на уровне содержания более 1%от максимального пика в хроматограмме) являются четные кислоты с 12 - 18 атомами углерода: C18:1, C16:0, C18:2, C18:0, C16:1 (в порядке уменьшения содержания в профиле ЖК), а также полиненасыщенные ЖК C20:n, C22:n, холестерин, насыщенные прямоцепочечные альдегиды и 2-гидроксикислоты. Иногда величину 1% превышает содержание длинноцепочечных кислот C20 - C26. Нечетные кислоты - C15:0 и C17:0 составляют около 1% каждая.

Перечисленные выше вещества являются липидными компонентами клеток организма человека и составляют естественный фон, на котором в исследованных пробах выявлены минорные компоненты, специфичные для микробных клеток.

Таблица 8

Дисбактериоз при энтероколите у детей

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Микроорганизм	**Норма**	**Sok**	**Ira-**	**Ageeva**	**Arman**	**Arman**	**Ashlak**	**Bobrov**	**Чередн**	**Elisee-**	**Galakt-**	**Golovl**	**Kamen**	**Karnis**	**Makar-**	**Manog**	**Osipov-**	**Petruch**	**amozhe**
Streptococcus	249	0	0	207	0	209	0	257	0	101	0	0	0	0	49	0	103	107
Eubacterium lentum (группа A)	68	165	355	260	547	370	145	143	107	88	133	142	171	447	86	233	169	122
Bacillus cereus	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Clostridium hystolyticum	95	7	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0	4	0	0	49
Nocardia spp	262	1036	213	137	285	182	166	259	256	178	122	118	116	418	214	96	439	1426
Peptostreptococcus anaerobius	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Moraxella/Acinetobacter	0	0	6	5	7	41	5	11	2	9	18	7	0	10	3	0	7	5
Pseudomonas aeruginosa	0	4	6	8	6	5	3	2	3	2	2	3	5	10	7	3	4	0
Clostridium propionicum	288	27	0	26	67	0	0	0	0	0	0	13	0	0	17	0	0	0
Stenotrophomonas maltophilia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pseudonocardia	70	13	18	11	3	29	2	2	7	8	2	7	15	24	8	12	9	10
Streptomyces	62	132	104	59	130	87	79	86	128	72	72	49	64	84	19	93	69	68
Clostridium ramosum	2000	3603	2325	1420	1782	3473	2066	1305	2383	1405	1812	1981	2082	2552	1804	1450	3007	1776
Fusobacterium/Haemophylus	0	1	3	0	1	19	1	6	2	19	6	4	1	0	5	0	5	0
Alcaligenes	48	30	27	25	39	39	25	34	27	17	13	23	27	51	13	5	25	23
Rhodococcus	423	128	294	205	274	471	156	150	142	174	179	120	273	414	137	178	178	225
Corinebacterim	605	214	155	89	188	244	123	91	152	124	104	77	99	198	45	126	105	105
Lactobacillus	6613	3215	2572	1559	3275	4309	3625	2632	3246	2696	2186	2913	2080	4009	1698	2914	3661	2948
Mycobacterium/Candida	549	553	317	181	304	341	380	267	301	286	216	160	208	393	178	211	465	766
Enterobacteriaceae (E.coli и др)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	65	0	5	0	3
Cl.difficile	385	210	273	176	329	319	144	111	162	104	171	124	152	321	62	164	150	139
Prevotella	38	28	41	29	43	87	29	40	31	48	28	30	26	90	30	17	26	35
Eubacterium spp	6912	1510	6157	4515	9905	12051	2998	3057	1321	1897	2713	3410	3496	8468	2557	5753	5052	2205
Bacteroides fragilis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Staphylococcus	120	93	129	108	184	191	88	73	91	77	83	68	77	174	42	109	90	80
Bifidobacterium	5067	121	4083	4026	5331	9162	1942	1361	1291	1275	2721	2074	245	8789	1350	1733	3066	1242
Helicobacter pylori	14	19	20	24	25	52	14	15	15	26	18	9	15	34	23	13	12	15
Clostridium perfringens	12	18	12	9	10	16	8	8	11	16	6	8	7	17	13	12	7	7
Enterococcus	290	196	219	169	282	380	217	112	132	105	156	147	143	217	71	171	249	196
Propionibacterium spp	4480	1298	2257	2115	5877	4274	2150	964	1061	1503	1055	898	1454	4921	1001	1824	1245	841
Streptococcus mutans	229	116	160	85	185	313	115	92	90	161	95	121	90	210	124	163	91	203
Herpes	59	0	17	185	33	65	0	6	7	7	13	10	12	59	6	4	0	0
Микр грибы, кампестерол	842	173	75	102	375	269	73	97	127	88	230	293	110	253	171	92	120	60
Nocardia asteroides	274	357	300	190	312	492	288	181	310	150	85	332	455	292	114	500	395	198
Цитомегаловирус	166	154	15	104	34	138	0	0	48	110	10	7	8	328	41	981	5	0
Микр грибы, ситостерол	384	82	74	71	205	138	43	45	61	46	112	149	67	118	81	55	57	32
Ruminicoccus	640	1134	814	266	431	673	449	328	516	233	238	171	208	779	257	406	760	885
***E.lentum* 7741 (группа B)**	0	13	18	49	0	106	39	4	1	33	15	20	27	101	17	3	28	13
Butyrivibrio/Cl. fimetarum	0	22	1	5	0	0	1	38	63	1	2	9	14	0	0	0	0	0
Actinomyces viscosus	1190	501	624	428	728	1055	555	403	384	470	471	465	499	914	325	479	396	479
Propionibacterium jensenii	0	2	26	5	120	0	22	94	6	16	9	0	7	0	0	8	0	0
Helicobacter mustelae	140	41	161	162	198	253	55	44	34	31	117	87	107	264	45	67	106	39
Сумма	34341	15790	22655	17266	31612	40438	16146	12707	13017	11825	13697	14415	12801	35185	10628	18322	20420	14565

Как видно из экспериментальных данных (табл. 8) изменения носят как общий, так и индивидуальный характер. Случаи избыточного роста части микробиоты выделены желтым цветом ячеек в табл. 8. Их выбор произведен в соответствии с критерием двукратного превышения нормы, определенным ранее по статистической границе нормального распределения концентраций микробных маркеров в крови здоровых людей в сравнении с больными [Beloborodova, 2000]. Общим признаком основной группы детей является более чем двукратное превышение концентраций *Eubacterium lentum, Moraxella/Acinetobacter* (рис 1), *Pseudomonas aeruginosa, Butyrivibrio/Clostridium fimetarum* и *Propionibacterium jensenii*.

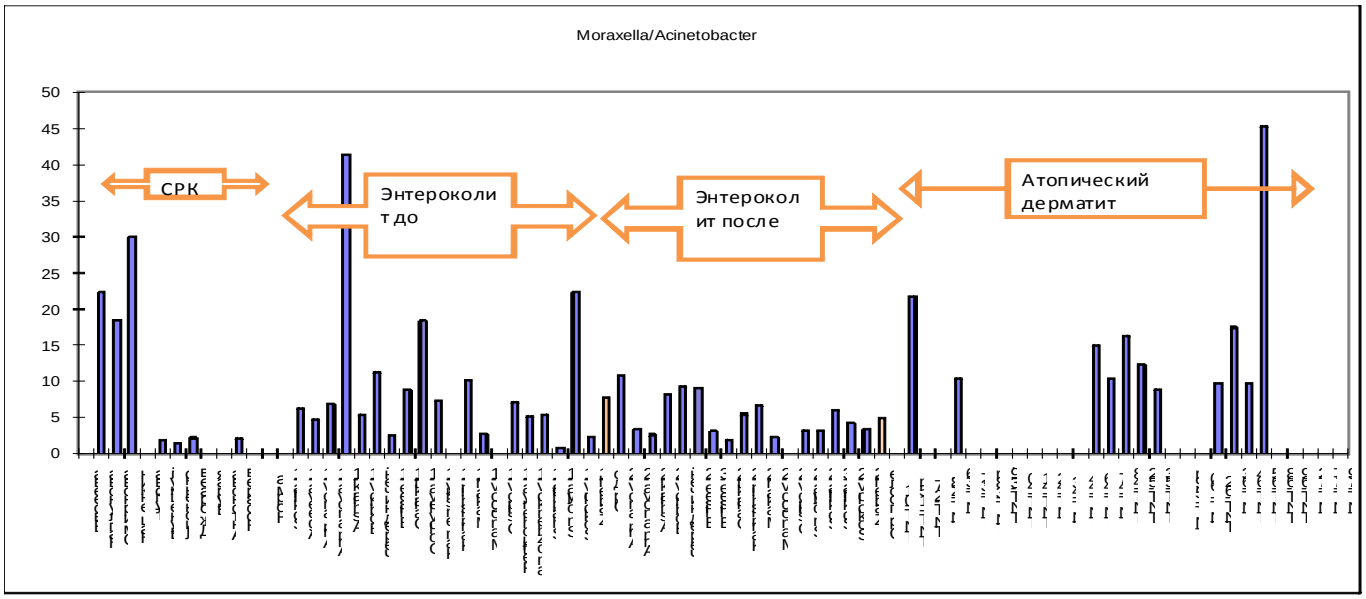


Рис.9. Численность грамотрицательных микроорганизмов группы Moraxella-Acinetobacter у детей с энтероколитами до и после лечения (в центре диаграммы) и больных атопическим дерматитом и СРК (группы по краям диаграммы)

К частным признакам относится прирост численности грамотрицательных микроорганизмов группы *Fusobacterium/Haemophylus* – 7 из 22 (31,8 %), видов сем. *Enterobacteriaceae (E. coli, Proteus, Klebsiella* и другие – у них общие маркеры в ранге семейства) – 4 из 22 (18,2 %), *Helicobacter pylori* – 4 22 (18,2 %). В двух случаях отмечена активность цитомегаловируса, *Clostridium perfringens, Bifidobacterium* и основной группы эубактерий (*Eubacterium moniliforme, E.nodatum, E.sabureum*). У всех детей с энтероколитом наблюдался общий дефицит микробиоты, как по суммарной колонизации, так и по большинству отдельных составляющих микробиоты (клетки таблицы 8 с голубым оттенком). Уровень колонизации слизистой кишечника снижен в два-четыре раза по сравнению с нормой из-за недостатка лактобацилл, эубактерий (род *Eubacterium*), бифидобактерий, пропионобактерий, актинобактерий, микроскопических грибов (не кандида) и других микроорганизмов. В этом усматривается аналогия с СРК и противоположная тенденция по сравнению с АТД, для которого характерен избыточный рост микроорганизмов кишечника как по сумме, так и по отдельным компонентам микробиоты (рис 10, эубактерии). Кроме того, при АТД более выражен разнополярный дисбактериоз. Исключение составляют три случая при энтероколите, когда при результирующей нормальной колонизации обнаруживается избыточный абсолютный рост бифидобактерий или эубактерий при равновеликом дефиците лактобацилл.

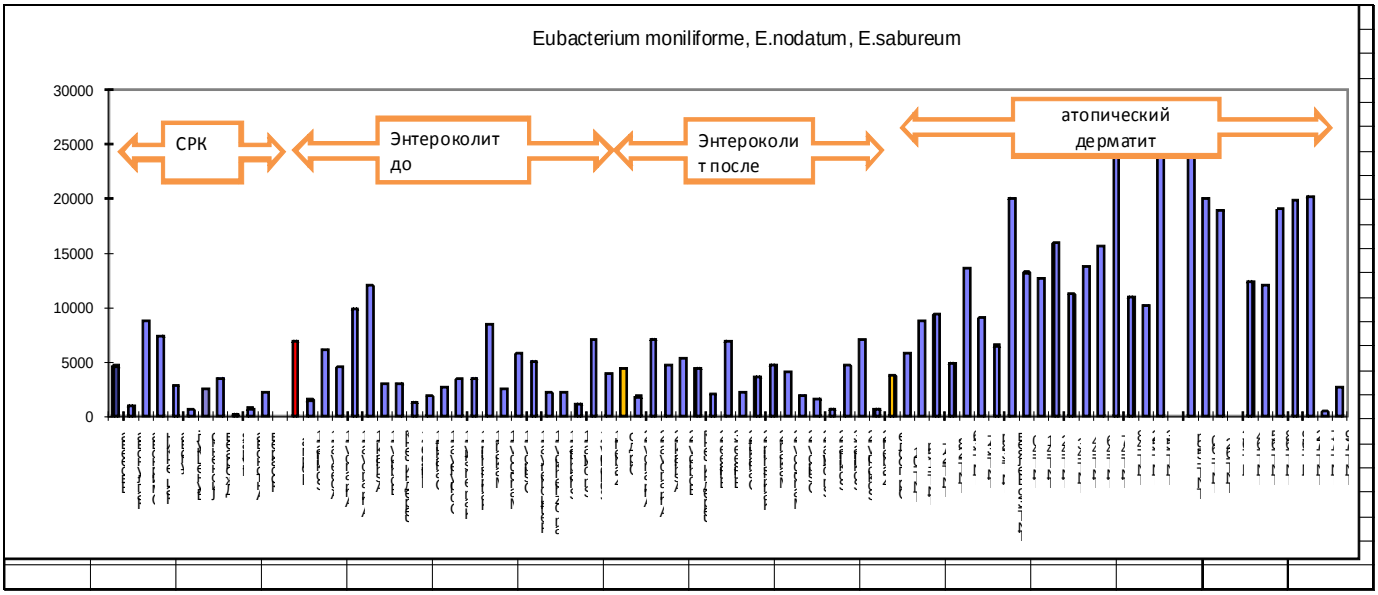


Рис.10. Численность микроорганизмов рода Eubacterium у детей с энтероколитами до и после лечения (в центре диаграммы) и больных атопическим дерматитом и СРК (группы по краям диаграммы)

Результаты анализа микробиоты после курса лечения кипфероном показали общую тенденцию к снижению численности инфекционной составляющей процесса более чем на 20% от исходной величины (до лечения), что является критерием достоверности измерений методом масс-спектрометрии подобного рода объектов исследования, или биологической воспроизводимостью метода масс-спектрометрии микробных маркеров в целом. Однако усреднение показателей в данном случае оказалось не эффективным, нивелирующим эффект лечения. Эффект лечения виден при индивидуальном сопоставлении профилей микроорганизмов до и после лечения. Например, у одного из детей была самая высокая численность бактерий группы *Moraxella/Acinetobacter*, которая в результате лечения снизилась более чем в 10 раз (рис 9), ниже уровня клинической значимости. У другого - эффект снижения инфекции по этим микробам – пятикратный, тогда как по усредненным данным эффект лечения выглядит скромнее – в среднем вдвое. Численность эубактерий, одного из основных представителей нормальной микробиоты по средним показателям не изменилась в процессе лечения (рис 10). Однако, если рассматривать данные пациентов в отдельности, то оказывается, что у одних превышение по численности вдвое скомпенсировано в результате лечения до нормы, а у других более чем двукратный дефицит по эубактериям восстановлен до нормы. В целом, возвращения суммарной колонизации к норме не произошло (в среднем по группе) – это остается проблемой наращивания микробиоты в процессе последующей реабилитации. Пока есть основания полагать, что в результате лечения произошла частичная нормализация ее относительного состава. Это показано в клинических случаях, приведенных ниже.

Случай 1. У ребенка до лечения обнаружен относительный избыточный рост клостридий группы Clostridium ramosum, Eubacterium lentum (группа А), актинобактерий Nocardia и Streptomyces, при дефиците эубактерий, бифидобактерий и пропионобактерий. Клинически значимый уровень в абсолютном выражении превышали Helicobacter pylori, Propionibacterium jensenii и Butyrivibrio/Cl. fimetarum. В результате лечения общий уровень колонизации кишечника вырос за счет увеличения свыше нормы эубактерий. Сократилась численность Clostridium ramosum, актинобактерий Streptomyces и Nocardia. Стало меньше (почти норма) грамотрицательных бактерий Moraxella/Acinetobacter и Fusobacterium/Haemophylus.

Случай 2. В первичном анализе ребенка найден избыточный рост клостридий группы Clostridium ramosum, Eubacterium lentum, актинобактерий Nocardia и Streptomyces. Клинически значимый уровень превышают грамотрицательные микроорганизмы родов Moraxella-Acinetobacter, Pseudomonas aeruginosa, Fusobacterium-Haemophylus, Prevotella, Helicobacter pylori, а также стафилококки, Clostridium perfringens, Streptococcus mutans, Propionibacterium jensenii, цитомегаловирус и Butyrivibrio/Cl. fimetarum. После лечения общий уровень колонизации кишечника вырос за счет увеличения сверх нормы эубактерий и бифидобактерий. Сократилась численность Clostridium ramosum, актинобактерий Streptomyces и Nocardia asteroides. Стало меньше грамотрицательных бактерий Moraxella-Acinetobacter и Fusobacterium-Haemophylus, а также ЦМВ.

Случай 3. Большой дефицит, как при СРК, при избытке Butyrivibrio-Cl.fimetarum и Propionibacterium jensenii видов Enterobacteriaceae (E.coli и др). После лечения дефицит сократился, численность условных патогенов сократилась. Имеется тенденция нормализации кишечной микробиоты.

В отдельных, единичных случаях результат лечения неоднозначен, когда численность одних условных патогенов снижается – других – возрастает или отрицателен: дефицит усиливается, численность единственного обнаруженного инфекционного агента – ЦМВ – возрастает.

5. Особенности пристеночной микробиоты при воспалительных заболеваниях толстой кишки у детей

Болезнь Крона (БК) и язвенный колит (ЯК), которые объединяются термином воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), представляют собой одну из наиболее серьезных и нерешенных проблем в современной детской гастроэнтерологии и колопроктологии. Но, несмотря на значимый прогресс в изучении генетических, иммунологических основ, а также влияния факторов окружающей среды в патогенезе ВЗК важные вопросы относительно особенностей кишечной микробиоты остаются мало изученными. Обследованы 34 ребенка с ВЗК (20 детей с ЯК и 14 детей с БК) в возрасте от 4

лет 8 мес. до 17 лет 10 мес. Количественно определяли состав микробных маркеров в биоптатах кишечника и сыворотке крови методом газовой хроматографии - масс-спектрометрии (ГХ - МС), а также титра АТ к лактобациллам и бифидобактериям методом иммуноферментного анализа (Ипатова, 2009). Показано, что как у здоровых детей, так и при ВЗК основу пристеночной микрофлоры толстой кишки составляют облигатные или факультативные анаэробы. По сравнению с контрольной группой в активную фазу заболевания у детей с ВЗК отмечается значимый рост большинства родов и видов микроорганизмов толстой кишки: *Rhodococcus spp., Ruminicoccus spp. Eubacterium spp., Propionobacterium spp., Bifidobacterium spp., Lactobacillus spp., Bacteroides spp, Clostridim spp*. (табл 9, рис) У детей с ВЗК была выявлено увеличение уровня АТ к лакто- и бифидобактериям, которые в норме обладают маловыраженной иммуногенностью.

Таблица 9

Микробиота биоптатов толстой кишки при ВЗК у детей

Микроорганизм, кл/гх10*6	ILT-379	ILT-377	ILT-404	ILT-403	ILT-402	Среднее	контроль*
Eubacterium lentum	800	356	883	1764	1289	1019	128
Nocardia	26	16	0	223	124	78	89
Moraxella/Acinetobacter	11	1	0	124	11	30	0
Pseudomonas aeruginosa	6	6	0	0	9	4	0
Clostridium propionicum	0	0	17842	329	0	3634	0
Актиномицеты	28	27	791	355	66	254	7
Clostridium ramosum	3866	4408	62986	45170	11210	25528	478
Fusobacterium/Haemophylus	14	10	203	89	163	96	9
Alcaligenes	63	45	516	237	137	200	18
Rhodococcus	407	731	6603	4371	906	2604	116
Corineform	131	165	890	678	255	424	54
Lactobacillus	5987	8480	105467	60126	13937	38799	1006
Campylobacter mucosalis	21	31	243	0	55	70	0
E.coli	0	52	0	42	0	19	0
Cl.difficile	360	176	1529	605	340	602	37
Eubacterium	8619	10074	33688	116545	46773	43140	414
Staphylococcus	378	234	3118	1002	925	1131	34
Bifidobacterium	572	5139	36532	35287	22381	19982	706
Clostridium perfringens	16	43	276	76	2557	593	41
Enterococcus	682	481	7706	3333	1686	2777	123
Propionibacterium spp	7120	4081	32391	34881	15583	18811	1192
Streptococcus mutans	1099	1405	18885	14348	3391	7826	344
Herpes	228	133	1384	246	43	406	13
Nocardia asteroides	272	311	5125	0	1107	1363	186
Цитомегаловирус	33	47	302	81	0	93	0
Микр грибы	382	52	598	98	89	244	5
Ruminicoccus	282	429	2097	3082	915	1361	30
Actinomyces viscosus	2638	2955	44647	20315	897	14290	249
Helicobacter mustelae	146	171	666	520	491	399	9
Сумма	35356	40980	400377	351135	129057	191381	5880

Результаты исследования свидетельствуют об изменении состава микроорганизмов в пристеночном слое кишки и увеличении продукции антител к представителям индигенной микробиоты при ВЗК, что указывает на ее непосредственное участие в возникновении и персистенции иммунного воспаления в стенке кишки.

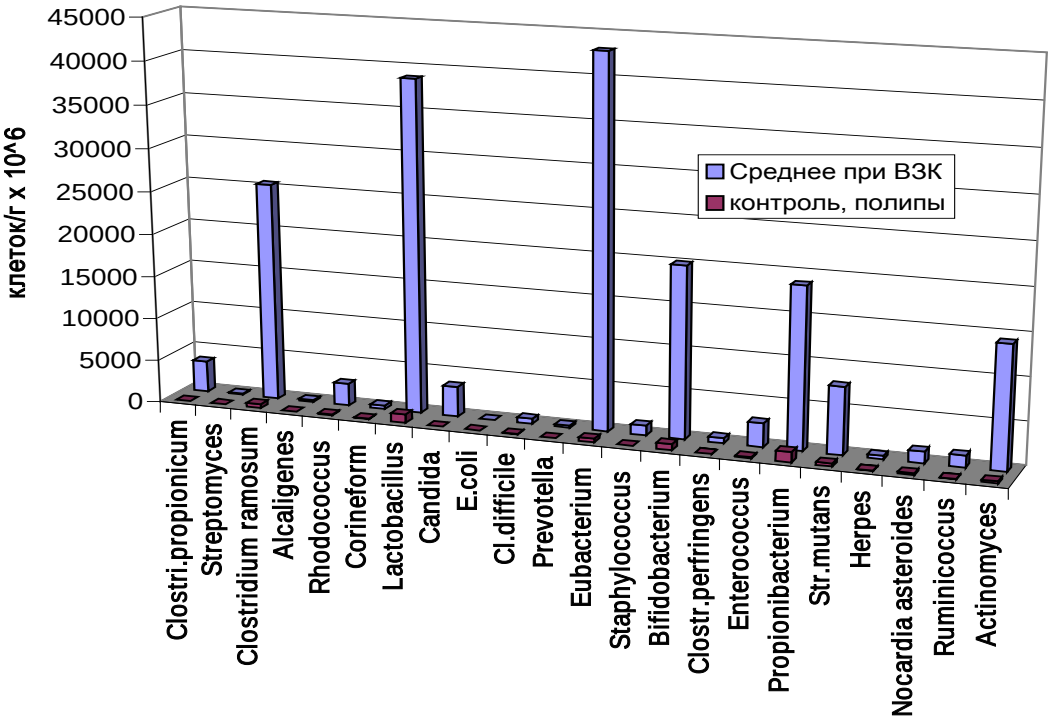


Рис. 11. По сравнению с контрольной группой (полипы) в активную фазу заболевания у детей с ВЗК многократно растет численность большинства родов и видов микроорганизмов толстой кишки

Реконструкция состава пристеночной микробиоты тех же пациентов по микробным маркерам крови показала, что в тощей кишке, напротив, возникает серьезный дефицит колонизации полезными микробами (рис 12)

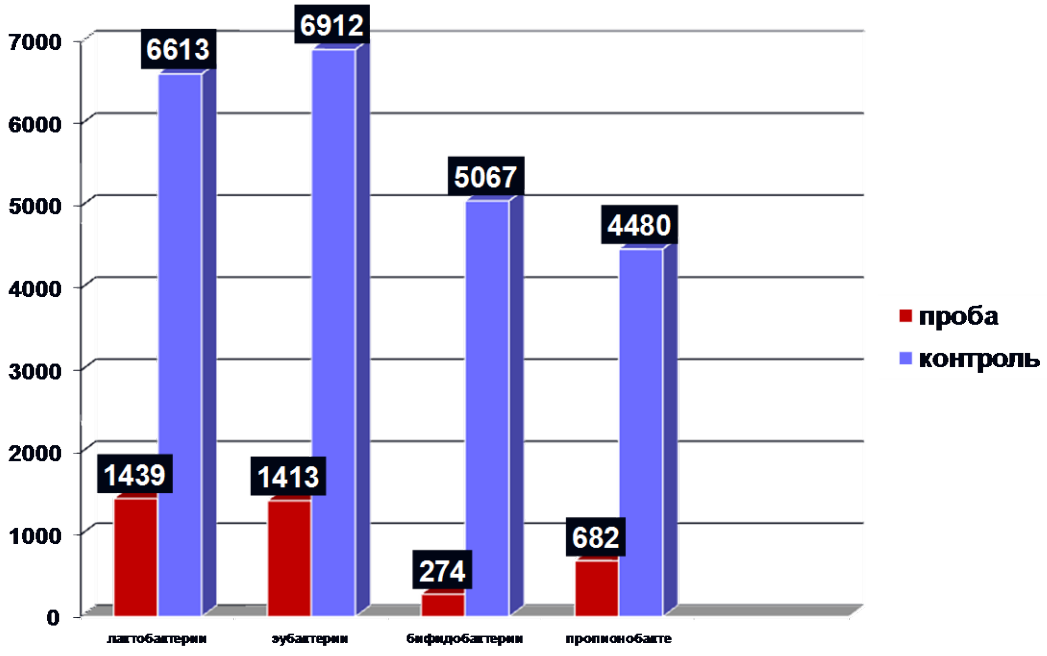


Рис. 12 Снижение численности полезных бактерий в пристеночном слое тощей кишки у детей с ВЗК. Проба – среднее значение в основной группе, контроль – среднее значение у здоровых

детей с домножением чисел на коэффициент 10^5, что дает эквивалентное концентрации маркера число клеток бактерий на мл.

6. Реакция пристеночной микробиоты толстой кишки на использование препарата Альфа-Нормикс в лечебном процессе

Суммарная колонизация стенки толстой кишки микроорганизмами у половины пациентов и в среднем как до, так и после лечения с применением Альфа-Нормикс оказалась более чем вдвое выше нормы, но персонально менялась хаотично. У одних после курса лечения уменьшилась до нормы, у других сохранился трех – пяти-кратный дефицит колонизации, а у третьих общая численность микроорганизмов выросла с перекомпенсацией два-четыре раза.

Численность лактобацилл в среднем не изменилась после курса Альфа Нормикс, при том что у одних пациентов она возрастала, у других уменьшалась, у третьих оставалась на прежнем уровне. То же относится к эубактериям (род Eubacterium) – средний уровень не изменился, но их численность менялась разнополярно. Бифидобактерии и пропионобактерии (группа P. Freudenreichii) а также другие нормальные обитатели толстой кишки – клостридии группы Clostridium ramosum часть актинобактерий (Rhodococcus, Actinomyces, Nocardia) дрожжи Candida в среднем не претерпели изменений (рис 13).

№	Микроорганизм	Клеток/г 10^5 До лечени	После
1	Streptococcus	6317	6790
2	Eubacterium lentum	4536	4354
3	Bacillus cereus	383	378
4	Peptostr. anaerobius	381	469
5	Streptococcus pneumonia	620	296
6	Nocardia	10959	12857
7	Peptostr. anaerobius	13	4
8	Moraxella/Acinetobacter	1513	1496
9	Pseudomonas aeruginosa	235	269
10	Propionibacterium	22	2
11	Bacillus megaterium	10	0
12	Clostridium propionicum	1050	492
13	Stenotroph. maltophilia	0	0
14	Selenomonas	437	0
15	Актиномицеты	855	535
16	Pseudonocardia	553	382
17	Streptomyces	1141	1006
18	Clostridium ramosum	64666	51362
19	Fusobacterium/Haemophyl	331	693
20	Alcaligenes	1041	858
21	Rhodococcus	9137	6154
22	Staphylococcus intermediu	1243	1256
23	Porphyromonas	7	8
24	Corineform CDC-group X	3386	3199
25	Lactobacillus	84690	92562
26	Campylobacter mucosalis	112	101
27	Mycobacterium/Candida	17460	14006
28	Enterobacteriaceae (E.coli	38	1149
29	Cl.difficile	3856	3681
30	Prevotella	1613	1097
31	E. moniliforme, E.nodatum	125207	117882
32	Bacteroides fragilis	231	168
33	Staphylococcus	2569	2057
34	Bifidobacterium	50398	42751
35	Helicobacter pylori	269	366
36	Clostridium perfringens	2666	12873
37	Enterococcus	6267	7165
38	Propionibacterium spp (P.f	65190	68599
39	Streptococcus mutans	14060	13593
40	Herpes	1145	775
41	Микр грибы, кампестеро	452	510
42	Nocardia asteroides	2321	3228
43	Цитомегаловирус	778	786
44	Микр грибы, ситостерол	891	846
45	Propionibacterium acnes	38	0
46	Ruminicoccus	6023	4267
47	Actinomycetes 10Me14	1485	1621
48	E.lentum 7741 (группа B)	1719	528
49	Enterococcus	38	0
50	Actinomyces viscosus	24021	22157
51	Aspergillus	38	0
52	Achromobacter	2560	2156
	Сумма	486395	489410

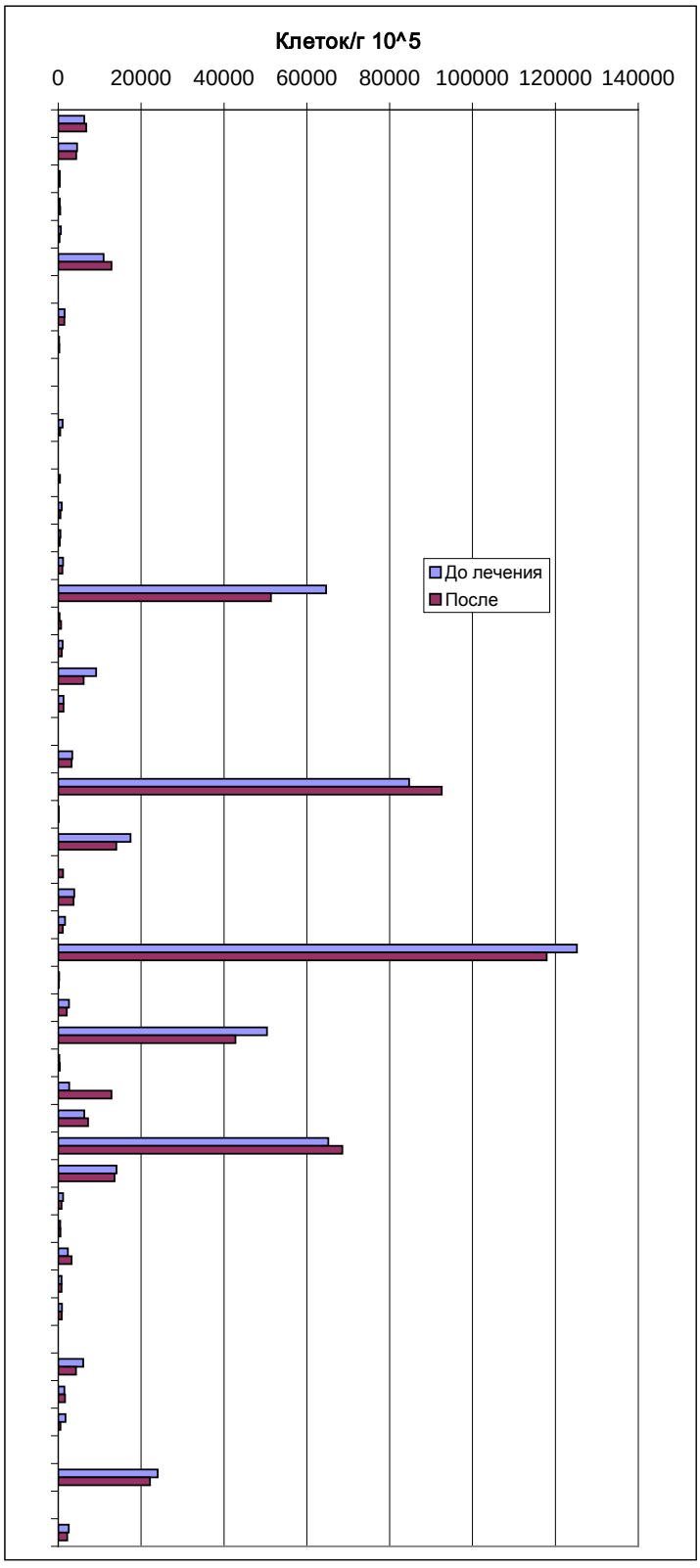


Рис. 13. Среднее значение численности микроорганизмов пристеночного слоя толстой кишки до и после лечения с использованием Альфа-нормикс. Рыжим цветом выделены значения, превышающие норму более чем в два раза. Бирюзовым – уменьшение численности после лечения, малиновым – увеличение.

Суммарный лечебный эффект проявился в среднем в уменьшении численности пневмококка, анаэробного пептострептококка, бактероидов (*Prevotella, Bacteroides fragilis*), селеномонад, вируса герпеса и части актинобактерий (рис. 13).

У некоторых пациентов существенно увеличилась численность *Clostridium perfringens* (рис. 13), что в целом дало рост инфекции после лечения. В общем, по группе возросла более чем на порядок концентрация маркеров представителей семейства *Enterobacteriaceae (E.coli* и другие) но тоже в основном из-за части пациентов. Примерно у половины пациентов увеличилась численность бактерий группы *Fusobacterium/Haemophylus*.

V. Коррекция понятий об инфекции и дисбиозе и дополнения к лечебным мероприятиям в связи с расширением круга диагностируемых микроорганизмов

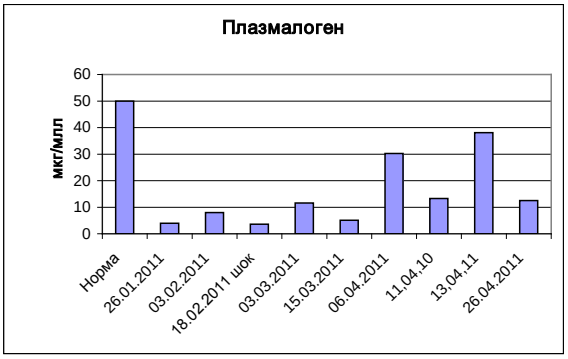
1. Вместо стадий дисбиоза – количественные отклонения по значимым микробам и сумме, эндотоксин, инфекционная нагрузка, плазмалоген –показатель здоровья

Возможность точных количественных измерений концентрации маркеров микроорганизмов при статистически выверенной норме позволяет проводить более гибкую оценку отклонения микроэкологии конкретного пациента от гомеостатичного состояния микробиоты кишечника и организма в целом. Причем не только по суммарной колонизации двух-трех главных полезных микроорганизмов, а по большому числу клинически и физиологически важных микроорганизмов в отдельности, по группам и в целом. В результате получаем многоплановую картину микроэкологических сдвигов на момент измерения или в динамике при многократных анализах крови методом МСММ одного и того же пациента в амбулаторных или стационарных условиях. Результат многодневного наблюдения пациента в отделении интенсивной терапии показано на рис 14. Совокупность измерений маркеров позволяет оценить общую колонизацию организма микробами – отдельная диаграмма микробиом, сумму превышений расчетной численности отдельных микроорганизмов над нормой, которая, по определению, классифицируется как инфекция, концентрацию плазмалогена, как маркера – показателя здоровья и общий липополисахарид (ЛПС), представляющий сумму ЛПС отдельных родов и видов грамотрицательных микроорганизмов. По данным каждого конкретного дня измерений можно выявить доминирующие в инфекционном плпне микроорганизмы. Они перечислены верхней части поля рисунка. Микроэкологический статус пациента менялся следующим образом. Первоначально, как у подавляющего числа пациентов после стресса, предшествующего госпитализации наблюдается многократная потеря микробов – здесь четырехкратный дефицит кишечной микробиоты при небольшом уровне инфекции, в том числе – грамотрицательной, и десятикратном снижении уровня плазмалогена.

Микроорганизмы, маркеры которых превышают норму в день анализа

		Alcaligenes	**Pept anaer**	Pept anaer	Eggertella	Eggertella	Eggertella	Eggertella	Eggertella	
	ramosum	Acinetobact	**Streptococc**	Streptococc	alcaligenes	alcaligenes	acinetob	acinetob	acinetob	
	Fusobact	Fusobact	**Acinetob**	P. aerug	herpes	herpes	herpes	herpes	perfring	
	Acinetobact	perfring	**perfring**	perfring	Butyrivibrio	Butyrivibrio	Nocardia	Butyrivibrio	alcaligenes	
		propinibact	**alcaligenes**	alcaligenes	propinibact	propinibact	P. aerug	P. aerug	P. aerug	
		P. aerug	**propinibact**	herpes			propinibact	propinibact		
			Nocardia	Fungi						

		1056						1059	1060	1069c	
	Норма	**26.01.2011**	**03.02.2011**	**18.02.2011 ш**	**03.03.2011**	**15.03.2011**	**06.04.2011**	**11,04,10**	**13,04,11**	**26.04.2011**	
Микробиом	34110	8054	8258	13957	17207	15200	21725	19641	27102	14104	**клеток/мл х 10*5**
Инфекция		105	342	4100	2190	3427	660	770	1005	354	**клеток/мл х 10*5**
Плазмалоген	50	3,97	8,0	3,62	11,6	5,12	30,24	13,3	38,1	12,5	**мкг/мл**
ЛПС	0,5	0,35	0,94	0,45	0,85	0,57	0,56	1,03	0,75	1,15	**nanomol/ml**



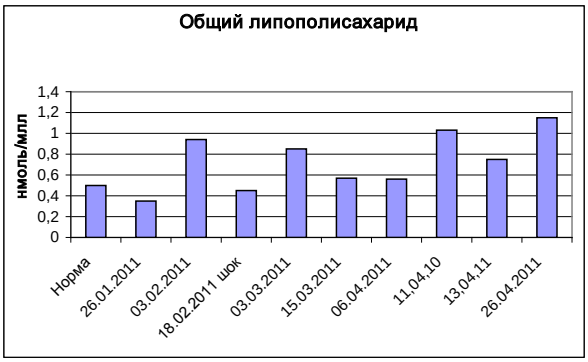


Рис 14. Динамика микроэкологического и инфекционного статуса в анализах крови одного и того же пациента методом МСММ в отделении инткнсивной терапии. Сепсис, 18.02.2011 – септический шок.

Плазмалоген является фосфолипидом, у которого в глицериновом фрагменте одна из жирных кислот замещена жирным альдегидом, обычно с 16 и 18 атомами углерода у животных и широким спектром ненасыщенных и разветвленных альдегидов у анаэробных бактерий. В растениях и грибах плазмалоген не встречается. В организме человека плазмалоген сосредоточен в миелине нервных клеток, в сердечной мышце, почках и сперме. Функции плазмалогена начали открываться совсем недавно. Известно или предполагается что он играет протективную роль в окислении полиненасыщенных ЖК, управлении выброса холестерина из клеток. Его продукция существенно снижена у больных с синдромом

Zellweger, Refsum disease и другими неврологическими заболеваниями. Деменция сопровождается снижением уровня плазмалогена (Zoeller, 2002).

Поскольку у плазмалогена, как известно, широкий спектр воздействия на клетки хозяина (стимуляция нервных клеток, метаболизм полиненасыщенных кислот, защита липопротеинов от окисления, осуществление межклеточных сигнальных функций и прочее), то он важен для поддержания нормальной деятельности его нервной системы (Gorgas, 2006). А ведь кишечная микробиота является резервуаром плазмалогена, входящего в значительном количестве в состав мембран анаэробов. Кроме эубактерий и бифидобактерий, он содержится в пропионобактериях, клостридиях, бактероидах и некоторых лактобациллах. Это более половины колонизации кишечных стенок. Ее дефицит (до семикратного при СРК) равнозначен такому же снижению концентрации плазмалогена, поступающего из бактерий в эпителий кишечной стенки для синтеза липидов клеток хозяина. Получается, что плазмалоген – это здоровье, здравомыслие и долголетие, которое в определенной степени поддерживают микробы, его производящие.

Далее, по диаграммам рис 14 отмечаются следующие события. В ходе лечебных мероприятий восстанавливается микробиота почти до нормального уровня. Вместе с этим растет и достигает максимума в септическом шоке общий уровень инфекционной нагрузки. Причем, за счет грамположительной составляющей, так как концентрация ЛПС в этот момент не превышает нормы. Действительно, агентами инфекции являются в этот день анаэробный пептострептококк, оральные стрептококки, нокардии и клостридии – грамположительные микробы, но при участии ацинетобактера.

Подобные, но разные изменения микробиоты кишечника происходят при любом стрессе: физическом, химическом, эмоциональном. Следствием является нарушение, порой устойчивое, обмена веществ в организме. В результате возникает диспропорция в поступлении биологически активных веществ, продуцируемых микроорганизмами, в организм хозяина и нарушение нормального функционирования его органов. Последствия могут быть патологическими, поскольку от микробиоты кишечной стенки зависит продукция более половины необходимых для человека витаминов, ферментов, факторов, сигнальных молекул, медиаторов и других гормоноподобных соединений, требуемых для обеспечения метаболизма и репродукции его собственных клеток и систем – иммунной, нервной, эндокринной и других. Пептидогликан клеточных стенок грамположительных микроорганизмов (они составляют абсолютное большинство пристеночной микробиоты кишечника человека) активно участвует в регуляции иммунного статуса хозяина на местном и системном уровнях. Считается, что именно микроэкологические изменения в организме хозяина являются запускающим механизмом подавляющего большинства патологических

процессов, и существует столько вариантов дисбаланса микробиоценозов человека, сколько известно нозологических форм заболеваний [Шендеров, 1998].

Поэтому микроэкологический статус человека, точнее, поддержание его гомеостаза, является необходимым условием стабильного функционирования всех его органов и систем. Соответственно, одним из первых этапов в реабилитации людей, переживающих экстремальные ситуации в силу особенностей своих профессий, жертв пожаров, катастров, отравлений, а также сильных эмоциональных потрясений должен быть контроль и восстановление микробиоценоза.

Аналогичные приведенному примеру (сочетанная травма при автокатастрофе) дисбиотические изменения с тотальным дефицитом кишечной микробиоты происходят и при других ситуациях. У больных СРК или ААД до семи раз снижается уровень колонизации кишечной стенки. У пациентов, выживших при падении с высоких этажей, на следующий день обнаруживается лишь десятая часть полезных микроорганизмов. Можно полагать, что они тоже переживают стресс и перестают размножаться. Их популяция восстанавливается при положительной динамике терапии с включением средст восстановления микроэкологии.

В то же время есть случаи неожиданного избыточного роста микроорганизмов, причем в короткое время, в течение дня наблюдений. У больного диабетом наблюдали синхронное увеличение концентрации маркеров микроорганизмов пропорционально содержанию сахара в крови пациента (Рис 15). Анализ крови на микробные маркеры проводили каждые три часа с одновременной регистрацией содержания в ней сахара. Трудно трактовать это явление иначе, как рост общей численности микроорганизмов кишечника. Деление клеток бактерий присходит каждые 20 мин. То есть этого времени достаточно для удвоения колонизации кишечника. На самом деле этого не происходит, так как рождение новых клеток сопровождается отмиранием адекватного количества старых, чтобы не нарушить гомеостаз. Но когда в крови появляется избыток сахара – лакомства для бактерий, - можно предположить сдвиг гомеостаза изобщебиологических соображений: любая популяция организмов имеет тенденцию к размножению при обилии пищи.

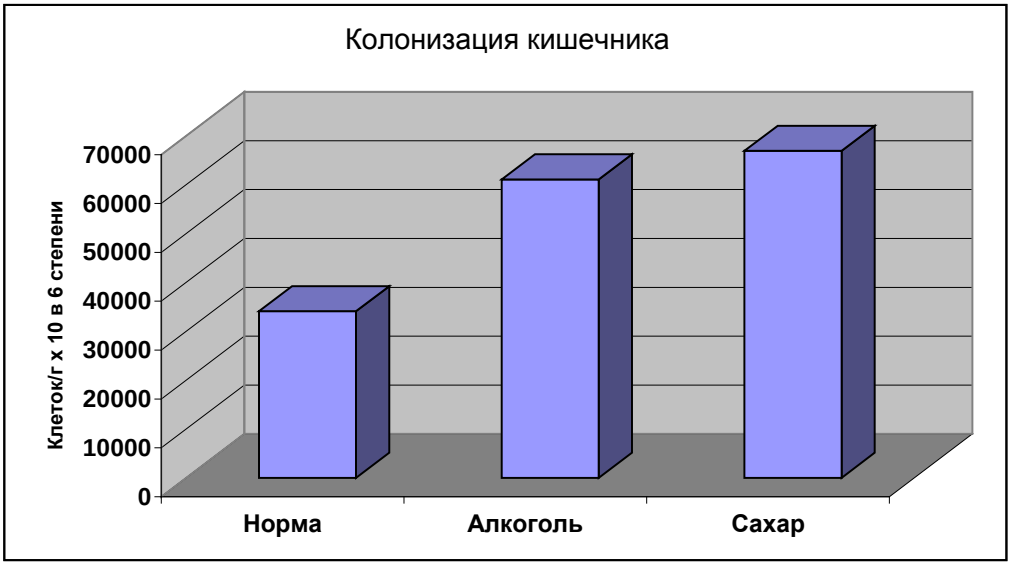


Рис 15. У алкоголиков обнаруживается общий избыточный рост микроорганизмов тощей кишки. У больных диабетом ее заселенность пропорциональна уровню сахара в крови.

Сдвиг гомеостаза микроэкологии был обнаружен у алкоголиков в процессе изучения методом МСММ алкогольного цирроза печени. В их крови также была обнаружена избыточная концентрация маркеров лактобацилл, эубактери, клостридий и других микроорганизмов, что соответствовало расчетному двойному увеличению колонизации тощей кишки.

В других, может быть, - менее драматичных ситуациях развиваются самые разные, порой неожиданные, виды дисбактериоза, подтверждающие тезис о его нозологической специфичности. При изучении дерматитов показана специфичность изменения состава микробиоты кишечника. Они описаны ранее в методических рекомендациях и статьях (Полеско, 2007; Клиническое значение.., 2011; Осипов, 2010). Кратко напомним, что при атопическом дерматите в микробиоте пристеночного слоя кишечника (посредством измерения микробных маркеров в крови) обнаружили дефицит бифидобактерий при избыточном росте видов *Eubacterium, Propinibacterium freudenreichii*, нокардий и других микроорганизмов. У больных себорейным дерматитом при дефиците лактобацилл и пропионобактерий в кишечнике высока концентрация маркеров клостридий группы *C.ramosum* и видов *Eubacterium.* При угревой болезни (акне) наблюдается дефицит лактобацилл при избыточном росте клостридий группы *C.ramosum*, бифидобактерий, вирусов герпеса и других микроорганизмов.

2. Еще о нозологической специфичности – заметки о первых анализах.

Здесь содержится предварительная на момент написания методических рекомендаций информация о первых интересных случаях изменения микроэкологии пациентов амбулаторного приема. Они не систематизированы в клинических исследования и не опубликованы в печатных изданиях. Мы приводим их как серию наблюдений, чтобы заранее ориентировать врачей, пользующихся методом МСММ, в интерпретации данных анализа или же показать его возможности в поисках инфекционной причины воспалений или синдромов непонятной этиологии.

В трех анализах крови на дисбактериоз пациентов с рассеянным склерозом выявлен драматический дефицит лактобацилл (до 100 раз по сравнению с нормой) при одновременном избыточном росте бифидобактерий (Рис 16)

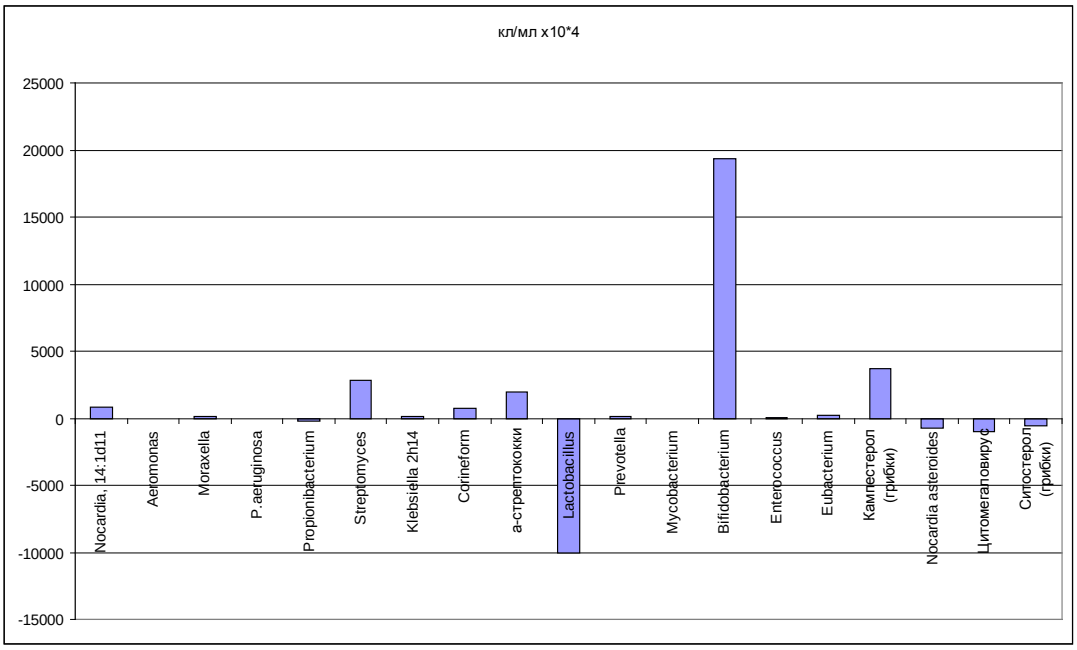


Рис 16. Рассеяный склероз, женщина, 42 года, дисбактериоз кишечника. Как корректировать такой дисбаланс двух полезных бактерий? Представлена разность между численностью микроорганизмов тощей кишки у пациента и нормой. Нулевые значения – совпадение с нормой.

Недавно обнаружен новый маркер, додекановая кислота (12:0), которая ранее не выделялась в количественном отношении в норме и патологии. Но у больного аутизмом ребенка она обратила на себя внимание (рис 17). Концентрация маркера соответствовала уровню 10^9 клеток/мл в пересчете на пристеночную микробиоту кишечника. При этом обнаружен тотальный четырехкратный дефицит нормальных микроорганизмов. Литературный поиск, показал с одной стороны, что эта ЖК присутствует в большом количестве в мембране четырех клостридий: Clostridium perfringens, C. putrefacience, C. hystolyticum, C. Tetani. С другой - что многие исследователи связывают аутизм с

инфицированием C. Tetani (Bolte, 1998). Ретроспективный поиск в наших старых файлах показал, что кислота 12:0 была в избытке у пациентов с шизофренией, ревматоидным артритом, тяжелых дерматитах (в том числе - при акне), а также при воспалениях молочной железы.

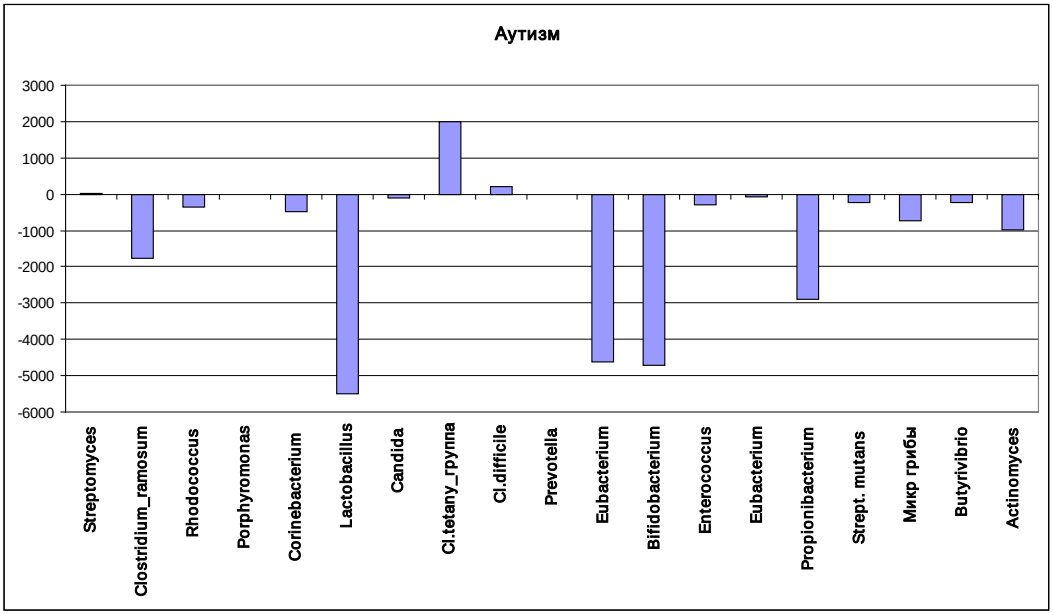


Рис. 17. Избыточный рост клостридий группы C. tetany при общем дефиците кишечной микробиоты у больного аутизмом.

Осенью 2012 года было замечено появление нового стеринового метаболита, по структуре близкого к уже используемому нами холестадиенону для контроля за цитомегаловирусом. Его появление в крови пациентов сочеталось с дефицитом кишечной микробиоты. В анамнезе пациентов и диагнозе обнаруживался синдром хронической усталости (СХУ), субфибрильная гемпература, блуждающая инфекция, мышечные боли, изнуряющий кашель без обычных признаков инфекции, дерматиты. Действительно, «наиболее убедительной в настоящее время является инфекционная или вирусная теория. Согласно этой теории, триггерными факторами СХУ могут служить вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловирус, вирус герпеса 6 типа, вирус Коксаки, гепатит С, энтеровирус, ретровирус. Дебют СХУ нередко связан с острым гриппоподобным заболеванием. Убедительными представляются также данные о высокой частоте обнаружения герпесвирусов и признаков их реактивации. Полностью не исключается возможность существования до сих пор не идентифицированного вируса (вероятнее всего, из группы герпес-вирусов), вызывающего СХУ, в то время как другие известные вирусы (EBV, CMV, HHV-6 и др.) могут играть вторичную роль, реактивируясь на фоне нарушений иммунного статуса и поддерживая их» (Википедия).

3. Выбор антибиотиков и коррекция лечения

При инфекционном процессе различной локализации предпочтение отдается антибактериальным средствам, из которых наиболее безопасны и хорошо переносятся антибиотики из группы макролидов, препараты фузидинового ряда и противомикотические средства. Их выбор должен быть индивидуальным и определяться активностью воспалительного процесса, качественным и количественным фоном условно-патогенной флоры, безопасностью препарата для данного возраста.

Для большинства врачей препятствием к использованию данных МСММ является отсутствие привычных данных по антибиотикочувствительности конкретного штамма микроба, выделенного из клинического материала пациента. Принимают данные и получают эффект в лечении больного те врачи, которые имеют возможность творчески подойти к их использованию: расширить свои познания в микробиологии и обратиться в интернет в поиске клинических проявлений микроорганизмов и их восприимчивости к антибиотикам, а также опыта врачей, уже имевших аналогичный клинический случай. Нами подготовлены краткие сведения по способам регулирования микроэкологического статуса при инфекции и дисбиозах (информация из литературных источников и опыта врачей, использующих метод масс-спектрометрии микробных маркеров). Эти сведения, полностью или частично (в соответствии с выявленными агентами инфекции или дисбиоза) мы предоставляем лечащему врачу вместе с результатами анализа.

Таким образом, по первичному анализу назначение антибиотиков производится по справочным и оригинальным литературным данным в отношении микроорганизмов, проявляющих избыточный рост – увеличение численности более чем вдвое по сравнению с нормой. Спустя сутки после достижения терапевтической концентрации антибиотика производится повторный ГХ-МС анализ, на основании которого определяется эффективность первичного назначения и проводится его коррекция с учетом микроорганизмов, не изменившим численность, а тем более обнаруживающих ее наращивание или конкурентный рост, как оппортунистическая микробиота. Экспрессность метода МСММ позволяет мониторировать лечение.

Из общих соображений, можно считать такой подход более рациональным по сравнению с тестированием резистентности клинического штамма *in vitro,* поскольку он, во-первых, редко является истинным или единственным агентом воспаления, а во-вторых – чувствительность *in vivo,* как известно, далека от чувствительности в чашке Петри. Точнее – микробное сообщество в состоянии биопленки при *quorum-sensing* игнорирует любые самые сильные антибиотики. По нашим данным пристеночная микробиота кишечника крыс устойчива к ударным дозам антибиотика при длительном пероральном введении. Опытные

врачи это понимают и в качестве препаратов выбора при гнойно хирургических инфекциях, например, предлагают назначать аугментин, метронидазол и амикацин, хотя эта рекомендация логически мало связана с практикой преимущественного высевания стафилококка, клебсиелы или псевдомонад из клинического материала. Тем не менее, эти препараты оказываются эффективными. Метод МСММ объясняет, почему. Оказывается, что наиболее частыми агентами гнойных инфекций являются клостридии, эубактерии, другие анаэробы, а также актинобактерии, которые чувствительны к указанным препаратам.

Антибиотики не разрушают микробиоту кишечной стенки, как показывают опыты на крысах [Дъяченко, 2006] и мониторинг антибиотикотерапии в клинике.

Метод МСММ позволяет определять микроорганизмы, не контролируемые в клинической практике. Это большинство анаэробов и актинобактерии. Поэтому следует остановится на свойствах и антибиотикочувствительности наиболее важных из них.

Eubacterium – родственные клостридиям микроорганизмы, являющиеся одними из основных обитателей кишечника. Условные патогены с развитой системой видов и штаммов с универсальными свойствами. Эубактерии участвуют в качестве основных агентов во многих воспалительных процессах и синдромах: воспаления неизвестной этиологии, себорея, атопический дерматит, кахексия, воспаление кишечника, глютеновая энтеропатия, воспаление десен, средиземноморская семейная лихорадка, Yang Xiao-xia's “mysteriuos disease”, синдром раздраженного кишечника, воспаление легких, бактеремия, хронический синусит, болезнь Крона, периодонтит, артрит, простатит, муковисцидоз, эндометрит, эндокардит, неспецифический вагинит, врожденный порок сердца и другие. Основными функции эубактерий в организме человека являются: образование водорода, высвобождение гистамина, биотрансформация желчных кислот, индуцирование продукции провоспалительных цитокинов и TNF-alfa, а также противовоспалительного цитокина IL-10 (как ЛПС или клеточные токсины Грам+ патогенов) и другие. Эубактерии чувствительны к клиндамицину, амоксиклаву или ампициллин-сулбактаму. **Eubacterium lentum** известен как микроорганизм, ассоциированный с ректальным раком и продуцирующий хориогонадотропин-подобный имунореактивный материал. Известен также как агент септического артрита и синуситов.

Патогенность клостридий более известна в клинической практике. Они обладают широким набором экзотоксинов. У C.perfringens их насчитывается двенадцать. C. ramosum обладает близкой активностью, в том числе также может вызывать газовую гангрену, язвенный и некротизирующий колиты. Они известны как агенты септицемии, нефропатии, бактериемии и даже менингита.

По литературным данным амоксиклав, ампициллин-сулбактам (табл. 10) являются одними из эффективных препаратов в отношении C. Ramosum (Alexander, 1995).

Таблица 10

Восприимчивость C. Perfringens, C. Ramosum, C. inocuum, C. clostridioforme и контрольных штаммов из американской коллекции типовых культур (ФЕСС) к 11 антимикробным агентам

Organism and antimicrobial agent	MIC (μg/ml)[a]			MIC range (μg/ml) for control strain
	Range	50%	90%	
C. perfringens (ATCC 13147)[b] (11 strains)				
Penicillin G	0.25–2	1	2	0.5–1
Metronidazole	0.5–2	1	2	0.25–0.5
Clindamycin	0.06–2	0.25	2	0.06–0.125
Cefoxitin	0.5–2	2	2	1–2
Cefotetan	0.06–1	0.125	1	0.125–0.25
Imipenem	0.125–2	0.25	0.5	0.125–0.125
Meropenem	≤0.015–1	0.03	1	0.03–0.06
Amoxicillin-clavulanate[c]	≤0.03–0.25	0.03	0.25	0.06–0.25
Ampicillin-sulbactam[c]	≤0.03–0.5	0.06	0.25	0.06–0.125
Piperacillin-tazobactam[d]	0.03–4	0.125	1	0.06–0.125
Vancomycin	0.125–0.25	0.25	0.25	0.25–0.25
C. ramosum (ATCC 25582) (20 strains)				
Penicillin G	0.125–16	0.5	8	0.5–2
Metronidazole	0.06–4	0.5	1	0.5–1
Clindamycin	0.25–8	2	4	4–8
Cefoxitin	0.5–64	4	64	4–8
Cefotetan	0.125–128	1	64	1–4
Imipenem	0.25–1	0.5	1	0.25–1
Meropenem	0.125–4	2	4	1–2
Amoxicillin-clavulanate	≤0.03–0.5	0.125	0.25	0.06–0.25
Ampicillin-sulbactam	0.06–1	0.25	1	0.06–0.5
Piperacillin-tazobactam	0.06–2	0.06	1	0.06–0.25
Vancomycin	0.25–2	2	2	2–2
C. innocuum (ATCC 14501) (21 strains)				
Penicillin G	2–16	4	8	2–8
Metronidazole	0.5–1	1	1	0.5–1
Clindamycin	0.125–>32	1	1	0.25–0.25
Cefoxitin	64–128	128	128	64–128
Cefotetan	128–>128	128	>128	>128–>128
Imipenem	1–8	4	4	2–4
Meropenem	0.5–2	2	2	1–2
Amoxicillin-clavulanate	0.125–0.5	0.5	0.5	0.125–0.5
Ampicillin-sulbactam	0.25–1	0.25	0.5	0.25–0.5
Piperacillin-tazobactam	1–4	1	2	1–1
Vancomycin	2–8	4	8	4–4
C. clostridioforme (ATCC 25537) (20 strains)				
Penicillin G	2–>128	8	32	4–8
Metronidazole	≤0.03–0.5	0.06	0.125	≤0.03–0.03
Clindamycin	≤0.015–4	0.03	1	0.125–0.25
Cefoxitin	2–32	4	32	8–16
Cefotetan	1–8	2	8	2–4
Imipenem	0.125–4	2	4	1–4
Meropenem	0.125–4	2	2	0.25–1
Amoxicillin-clavulanate	0.06–4	0.25	0.5	0.25–0.5
Ampicillin-sulbactam	1–16	2	2	0.5–2
Piperacillin-tazobactam	1–128	8	16	1–4
Vancomycin	0.125–1	0.125	0.25	0.25–0.25

[a] 50% and 90%, MICs at which 50 and 90% are inhibited, respectively.
[b] The American Type Culture Collection (ATCC) strains given in parentheses are the control strains.
[c] Tested at a ratio of 2:1.
[d] Tazobactam was held constant at 4 μg/ml.

Однако даже при малых абсолютных концентрациях (до $3{,}8 \times 10^7$ клеток/мл в анализе) ***C. perfringens*** **нельзя недооценивать** в патологическом плане: этот микроб образует как

минимум 12 идентифицированных токсинов и энтеротоксин. Мишени для основных токсинов – биологические мембраны в различных тканях. Поражения обуславливают ферментативные процессы, катализирующие гидролитическое расщепление и нарушение клеточной проницаемости с последующим отеком и автолизом тканей, характерными для газовой гангрены. Наиболее обширный список антибиотиков, эффективных в отношении клостридий и других анаэробов, представлен в работе Goldstein [49].

H. pylory – микроорганизм, хорошо известный участием в микробной этиологии язвенной болезни, в последнее время обнаруживается и в других органах – полости рта, печени, прямой кишке, атеросклеротических бляшках. На этом фоне обнаружение H. pylori в других отделах пищеварительного тракта в норме и патологии не выглядит странным. Патогенность *H. pylory* известна: проникая через слизь, бактерии прикрепляются к эпителиальным клеткам, проникают в железы слизистой оболочки. ЛПС микроорганизмов способствует миграции нейтрофилов и развитию острого воспаления. Под действием бактериальной уреазы мочевина превращается в аммиак, повреждающий слизистую оболочку.

Антибиотикотерапия хеликобактера общеизвестна. Однако она направлена по существу на геликобактер-*ассоциированную* инфекцию, составляющие которой в язвенной болезни, как правило, неизвестны. Поэтому она представляет собой эмпирический набор антибиотиков трех – четырех групп на все возможные случаи ассоциатов. Их (группы) назначают последовательно до эрадикации *H. pylory* . В условиях применения метода МСММ мы получаем полный микробный пейзаж, что позволяет выстраивать этиотропную антибиотикотерапию, если в ней есть необходимость.

Актинобактерии (или – аэробные актиномицеты). Неожиданным результатом является обнаружение в кишечнике значительного количества аэробных актиномицетов. Специфичность их маркеров - миколовых кислот - не позволяет предполагать какие-либо иные таксономические группы микроорганизмов, кроме представителей порядка Actinomycetales. Они содержаться в микобактериях, нокардиях, родококках, видах Actinomadura и других актинобактериях, но не найдены у высших организмов (грибов, растений, животных). Присутствие этих молекул в биоптатах кишечника, крови и других органах и жидкостях человека подтверждается масс-спектрами, а также их анализом в составе музейных культур соответствующих микроорганизмов. Бактерии родов Streptomyces и Nocardiopsis подтверждены также уникальным маркером изо-гексадекановой кислотой (i16). Кроме того, Nocardiopsis dassonvilley выделен в чистой культуре из кишечника

Если учесть, что до настоящего времени в некоторых руководствах по микробиологии, как и ранее, род Bifidobacterium относят к семейству Actinomycetaceae, то окажется, что актиномицеты филогенетически близки традиционно известным представителям

пристеночной микробиоты кишечника. Они повышают значимость микробиоты кишечника для организма хозяина, так как актиномицеты превосходят все прочие микроорганизмы по продукции антибиотиков и витаминов и обладают мощным ферментативным аппаратом. Высокая степень колонизации кишечника актиномицетами не выглядит необычным явлением, если иметь в виду, что они широко распространены в окружающей среде – почве, воде, воздухе, на внутренних стенах жилых и производственных помещений (Anderson, 1997). Их обитание в организме человека при таких обстоятельствах выглядит естественным. Действительно, в руководствах по клинической микробиологии отмечается обнаружение актиномицетов и родственных организмов, таких как Mycobacterium, Actinomadura, Propionibacterium, Actinomyces, Corynebacterium, Bifidobacterium в кишечнике и других органах человека. Там они фигурируют (в том числе и бифидобактерии) как участники инфекционных и воспалительных процессов (Manual, 1991).

Однако патогенность актиномицетов, чувствительность к антибиотикам, способы лечения связанных с ними заболеваний являются предметом единичных специализированных лабораторий и клиник в мире. Трудности в их бактериальной диагностике и культивировании послужили препятствием широкой известности этих микроорганизмов в клинической практике, в том числе при многочисленных заболеваниях, связанных с изменением микробиоты кишечника.

Ванкомицин и **амикацин** эффективны в случае участия в инфекционном процессе аэробных **актинобактерий: стрептомицетов, нокардий, родококков**, которые довольно часто включаются в микст-инфекцию обследованных нами больных.

Родококки – факультативные внутриклеточные актинобактерии, способные персистировать и вегетировать в макрофагах и других клетках высших организмов, вызывая в конечном счете их разрушение. Результирующее действие родококков вызывает поражение тканей аналогичное микобактериям туберкулеза (Linder, 1997). Они вырабатывают ферменты, гидролизующие липиды (например – холестеролоксидазу) которые токсичны для организма человека и животных. Биопсия тканей, пораженных родококками, выявляет многочисленные полиморфоядерные лейкоциты, вспученные клетки и каверны с внутриклеточными бактериями. Большинство штаммов родококков чувствительны к гликопептидным антибиотикам, включая ванкомицин и тейкопланин, и к рифампину. Макролиды, такие как эритромицин и кларитромицин также ингибируют рост многих штаммов. Родококки устойчивы к бета-лактамным (за исключением карбапенемов, особенно имипенема) антибиотикам, хотя это свойство не связано с продукцией бета-лактамазы. У имеющих контакт с домашними жи вотными нередко причиной пневмонии и распада легкого является Rodococcus equi. Поскольку это внутриклеточный патоген, антибиотик должен

проникать внутрь клеток. В таких случаях длительно применяют комбинацию эритромицина (или других новых макролидов) с рифампицином

Propionibacterium freudenreichii - типовой вид рода Propionibacterium, грамположительных анаэробных или анаэротолерантных бактерий, продуцирующих при ферментации сахаров и молочной кислоты пропионовую и уксусную кислоты, а также двуокись углерода. Используется в качестве стартовой культуры при производстве сыров. Являются перспективным пробиотиком вследствие их способности ингибировать рост нежелательной микрофлоры, а также стимулировать рост бифидобактерий и ферментативную активность кишечника. В присутствии P. freudenreichii кишечные микробы создают мукоз повышенной плотности, способствующий размножению многочисленных видов микроорганизмов и физическому препятствию обменных процессов. В комбинации с P. aeruginosa и другими грамотрицательными микроорганизмами P. freudenreichii обуславливают накопление вязкой мокроты в легких при муковисцидозе, а при пиелонефрите, простатите и воспалениях верхних половых органов женщин снижают проходимость протоков и мембран (Осипов, 2007).

Таблица 11.

Чувствительность P. freudenreichii и Actinomyces viscosus к антибиотикам

	MIC, минимальная активная концентрация		
Антибиотик	диапазон	50%	90%
ABT-773 (кетолид)	0.015–4	0.015	0.015
Erythromycin	0.03–.128	0.06	0.25
Azithromycin	0.03–.32	0.06	0.25
Clarithromycin	0.015–.32	0.03	0.06
Roxithromycin	0.015–.32	0.015	0.25
Penicillin G	0.015–0.5	0.03	0.25
Ampicillin-sulbactam	0.015–1	0.06	0.25
Cefotaxime	0.015–1	0.125	1
Cefuroxime	0.03–1	0.125	0.5
Levofloxacin	0.125–1	0.25	0.5
Tetracycline	0.5–4	1	2

4. Применение пробиотиков и других корректоров микробиоты кишечника

Что касается действия сухих пробиотиков, то в практике терапии в ЦНИИГ положительная динамика в клиническом течении заболевания начинала появляться со 2–3-го дня лечения бифиформом, а дисбиотические изменения кишечника восстанавливались более медленно (Парфенов, 2002). Аналогичные данные получены при применении у детей с хроническим гастродуоденитом Ацилола – комбинированного пробиотического препарата из смеси живых облигатных ацидофильных лактобацилл (Lactobacillus acidophilus NK1, NK2, NK5, NK12) и полисахарида кефирных грибков (Новикова, 2011). Вероятно, одного пробиотика, даже бинарного и при десятикратной дозе недостаточно для быстрой стимуляции роста всех бактерий, находящихся в дефиците (тем более не входящих в состав пробиотика). Кроме того, довольно часто полярность изменения концентрации ключевых микробов оказывается в противофазе. Вы стимулируете бифидобактерии – а их и так оказывается избыток и поэтому больной не отвечает на пробиотик. Также известно, что на восстановление численности медленно растущих микробов требуется продолжительное время.

Антипаразитарный препарат Гайро (орнидазол) после двухдневного курса лечения лямблиоза у детей приводил к снижению общей микробной нагрузки, при этом уменьшалось количество клеток всех выявляемых бактерий, в том числе Lactobacillus и Bifidobacterium. Суммарный уровень эндотоксина также значительно снижался. Полученные данные требуют коррекции микробиоценоза кишечника после применения этого антипаразитарного средства [Новикова, 2012].

Перспективным выглядит применение жидких пробиотиков типа нормофлоринов, биовестинов, Бифидум 791БАГ или трилакта. В них на два порядка больше живых бактерий ($N=10^{10}$), да еще жидкая среда в качестве пребиотика. Конечно, и этого мало, чтобы восполнить недостаток или подрастить дефицитные лактобациллы или бифидобактерии – дело не в этом. Поскольку в кишечнике их порядка 10^{14} , то добавка пробиотика не восполняет дефицита по количеству клеток, но на самом деле клинический эффект достигается. Можно предположить, что живые культуры бифидо- и лактобактерий вместе с частью культуральной среды содержат биокаталитические вещества, стимулирующие восстановление не только этих, но и других микробов – то есть восстановление кишечного гомеостаза.

Нормализующее действие на нарушенную микробиоту кишечника оказывает синтетический тетрадекапептид гепон. В отличие от большинства известных иммуномодуляторов гепон обладает противовоспалительными свойствами, противовирусной активностью, способностью к активации местного иммунитета, повышению устойчивости слизистой оболочки к инфекциям. Уровень колонизации микроорганизмами тощей кишки возрастает до пяти раз в сравнении с исходным уровнем, что актуально для больных СРК, у которых дефицит микробиоты может быть семикратным по сумме микроорганизмов. Базовые

кишечные микроорганизмы - эубактерии, бифидобактерии и клостридии достигают или превышают уровень нормы. Лактобациллы остаются ниже нормы, хотя их численность увеличивается на порядок по сравнению с первоначальной. По многим микробам - кокки, актиномицеты, энтеробактерии, грибы обнаруживается восстановление нормы или избыточный рост более чем на порядок (Парфенов, 2003).

Результаты количественного анализа широкого круга микроорганизмов кишечника в двух его отделах (тощая и ободочная) одновременно позволили выявить сложную картину перестройки микробиоты в результате применения в качестве регулирующего средства – пробиотика энтерола, представляющего собой препарат дрожжей Saccharomyces boulardii. Сопоставление микробных профилей до и после курса лечения энтеролом показали, что в тонком кишечнике происходят изменения, одинаково направленные у всех обследованных в сторону восстановления нормальной микробиоты (Парфенов, 2006). Однако ее восстановления до уровня колонизации практически здоровых людей не происходит, несмотря на положительные результаты по клиническим показателям. Тенденций к специфическому воздействию энтерола на определенные микроорганизмы или их группы при этом не выявлено. Энтерол более активен по отношению к микроорганизмам тощей кишки по сравнению с толстой. Это проявляется в общем увеличении уровня колонизации при исходном дефиците микробиоты, а также в преимущественном росте количества отдельных видов микроорганизмов. В фекалиях изменения происходят хаотично, как в отношении общего содержания в них микроорганизмов, так и отдельных членов сообщества.

Препарат висмута ДеНол (висмута трикалия дицитрат), как оказалось, обладает воспроизводимым эффектом оптимизации общего уровня колонизации тощей кишки и концентрации отдельных микроорганизмов (Осипов http://www.rmj.ru/articles_5556.htm). То есть нивелирование дисбактериоза в сторону нормы: уменьшение концентрации микробов, проявляющих избыточный рост, и увеличение численности дефицитных микробов. Так реагируют на ДеНол основные обитатели кишечника – бифидобактерии, эубактерии (E. moniliforme, E.nodatum, E.sabureum и пр.) а также пропионовые бактерии. К сожалению, исходный нормальный уровень лактобацилл в большинстве случаев понижается под действием препарата. Концентрации C. propionicum и C. hystoliticum при исходном низком уровне (на один-два порядка ниже нормы) после лечения увеличивают численность и достигают в ряде случаев нормального уровня. Численность C. difficile, как правило, уменьшается после лечения от 20% до шести раз. Численность актинобактерий (Actinomyces, Streptomyces, Nocardia), грибов и цитомегаловируса также имеет тенденцию к снижению. Заметно уменьшается количество энтерококков и стафилококков, изначально превышавших норму.

5. Модификация понятий и клинической процедуры при адаптации метода масс-спектрометрии микробных маркеров в клинической микробной диагностике

Метод МСММ благодаря своей экспрессности и информативности позволил в течение короткого времени внести ясность в ряд концептуальных проблем клинической микробиологии и микробной этиологии серьезных заболеваний. Получены экспериментальные данные, подтверждающие связь ряда заболеваний с изменением микроэкологического статуса организма, более того, нозологическую специфичность этого изменения. Возможность предметного обсуждения этого, предполагаемого ранее явления, обусловлена получением в короткие сроки точной и воспроизводимой, а значит – сопоставимой, информации о микробиоте человека в норме и патологии, а также и среди разных патологий.

Фундаментальным результатом клинических приложений метода МСММ является подтверждение количества микроорганизмов в теле человека, в основном – в его кишечнике: порядка 10^{14} клеток, что было известно из оценок другими методами. Кроме этого, удалось измерить состав микробиоты и показать ее гомеостатичность, что также предполагалось из исследований и обобщений ряда ученых, работающих в области медицинской микробной экологии. Метод МСММ оказался инструментом, с помощью которого можно доказывать ее постулаты или изучать механизм взаимодействия микробиоты с организмом-хозяином. Например, внести ясность в вопрос связи дисбактериоза с заболеваниями, которым он сопутствует.

Рассмотрим по-отдельности что меняется в наших представлениях об инфекции, дисбактериозах, септических и гнойно-воспалительных процессах и системных микробиозах в связи с данными, получаемыми методом масс-спектрометрии микробных маркеров.

Представление об инфекции. По устаревшему определению – инфекция есть размножение чужеродных организмов в теле организма-хозяина; размножение нормальной микробиоты не рассматривается как инфекция. Измерения методом МСММ позволяет уточнить круг микроорганизмов, обитающих в теле человека в норме и не относить их к инфекции. Например, распространенные среди врачей и пациентов выражения о стафилококковой, стрептококковой и многих других «инфекциях» выглядят терминологически некорректными, так как маркеры этих микроорганизмов обнаруживаются в норме на коже, в моче, в крови, в мазках и биоптатах слизистых оболочек разных органов. Маркеры дрожжей кандида также присутствуют в норме повсеместно. По существу ничего не меняется в представлениях об инфекции. Необходима только терминологическая аккуратность как результат медицинского образования и образованности, а также

медицинского просвещения населения. Кроме того, в приведенном выше определении отсутствует количественный фактор, который становится необходимым при использовании боле точного определения инфекции, которое дано академиком Воробьевым А.А., инфекции как избыточного роста микроорганизмов. Будет ли она патологически (клинически) значимой – зависит от количественной стороны процесса инфицирования органа. Для этого небходимо, чтобы возникла биопленка, прикрепленная к поверхности, чтобы число микробных клеток в ней превышало величину 10^3 для возникновения *quorum sensing* – обобщения генетической, трофической, энергетической и прочей коллективной активности микробного сообщества. В том числе токсической и патогенетической, если будут экспрессированы соответствующие гены.

Представления о патогенезе. Они тоже не меняются, если иметь в виду сведения, которые можно найти в научной литературе. К сожалению, они доходят до практического врача с большим запозданием. Поэтому, первое знакомство с результатами масс-спектрометрии выглядят неожиданными для тех, кто привык делить микроорганизмы на патогенные и непатогенные. На самом деле это деление можно характеризовать как условное. Данные масс-спектрометрии показывают, что патогенны (т.е. по определению – способны вызывать заболевание) все микроорганизмы. Пользуясь сетью Интернет можно легко убедится, что это действительно так, что лактобациллы и бифидобактерии – патогенны, и порой опасны для жизни, если являются причиной септического состояния. Это принципиально важное для пациента расширение понятия патогенности, которое теоретически дает ему надежду на гарантированное излечение, если микробиологи возьмут под контроль не только десяток аэробных микроорганизмов, позволяющих себя легко культивировать в искусственных условиях, но и все анаэробы и актинобактерии. Сейчас хорошо известно, что организм человека населяют более 500 видов микробов (менее известно, что генетики уже выделили более 1000 фенотипов микробных ДНК). Получается, что сейчас в клинике контролируют рутинно только около 1% потенциальных патогенов. Поэтому лечение заболеваний микробной этиологии происходит по-существу эмпирически. Анализ запаздывает на неделю, время, необходимое для выявления вида микроорганизма культурально-биохимическим методом. И при этом вероятность выявления истинного возбудителя ничтожно мала. Это подтверждается клинической апробацией метода МСММ. Стафилококки, псевдомонады, представители семейства энтеробактерий (кишечная палочка, протей, клебсиела и прочие) редко выступают в роли доминант микробной ассоциации при воспалениях. Как правило, ими являются анаэробы Clostridium, Eubacterium, Propionibacterium. Появляются публикации о доминировании видов Clostridium в кишечнике человека, обладающих широким спектром токсинов. И это логично, поскольку, даже по известным оценкам, без масс-спектрометрических уточнений, в организме человека

доминируют анаэробы (от 80 до 95% по разным данным). Значит на долю аэробов приходится максимум 20%. Из них 17 % надо отнести к аэробным актиномицетам (актинобактериям). Отсюда следует, что аэробы, преимущественно контролируемые в настоящее время в клинических бактериологических лабораториях, - стафилококки, энтеробактерии сем Enterobacteriaceae, другие неферментирующие грамотрицательные микроорганизмы родов Pseudomonas, Stenotrophomonas, Acinetobacter и другие, реже фигурирующие в результатах посевов микробы составляют около 3% возможных агентов воспалений. Следует признать, что эта часть микробиоты не свойственна организму человека.

Вероятность выявления реального патогена мала еще и по той причине, что его пытаются выявить в стерильной среде – моче, крови, ликворе, гное, экссудате – жидкостях, которые имеют развитую антигенную систему. В них не должны присутствовать жизнеспособные микроорганизмы. А вот молекулярные микробные маркеры - должны. По ним можно реконструировать с помощью расчетного механизма метода МСММ микробную ассоциацию, которая реально действует в виде биопленки в тканях и в мукозном слое слизистых оболочек. В процессе естественного отмирания микробных клеток или фагоцитоза их молекулярные маркеры попадают закономерным физиологическисм путем в эти жидкости.

Клиническая процедура при использовании МСММ претерпевает существенные изменения, связанные с увеличением объема микробиологической информации по каждой пробе больного, сокращением времени анализа до трех часов, вместо недель и появлением в результатах непривычных для микробиолога и врача редко культивируемых микроорганизмов – большинства анаэробов, актинобактерий и других. В период накопления нового клинического опыта, необходимого для разработки оперативных алгоритмов решения и их формализации в виде протокольных разрешительных документов (методик, пособий, статей в Госреестре и т.п.) она выглядит следующим образом:

- Определение биологических проб, подлежащих анализу в соответствии с диагнозом или симптомами заболевания, если диагноз отсутствует
- Проведение анализа по полному алгоритму МСММ
- Составление заключения *молекулярного микробиолога* по особенностям результатов по отношению к норме и их значимости
- Поиск информации в собственной базе данных или Интернет по специфике заболевания и связанных с ним микроорганизмов с измененной концентрацией и оценка их причастности к конкретной патологии
- Выбор антибиотика по имеющейся базе данных или поиск в Интернет, если необходимо подавление избыточного роста численности микроорганизма при

воспалениях, сепсисе, инфекциях ткани и избыточном росте микробиоты кишечника или УГТ и прочего

- Выбор стимуляторов роста микробов, если их дефицит угрожает нарушением физиологического гомеостаза макроорганизма
- Определение других мер для восстановления гомеостатической нормы органа или микроэкологического статуса организма больного в целом, включающих имуностимуляторы, пробиотики, пребиотики, энтеросорбенты, микроэлементы и т.п., а также диэтические и процедурные назначения, нормализующие деятельность кишечника и других органов, содержащих слизистые оболочки или иные компартменты обитания симбиотной микробиоты
- Контроль за реакцией больного на принятую терапию – мониторинг и коррекция лечения

Заключение. Место масс-спектрометрии микробных маркеров в исследовании микроэкологии человека

Полагают, что в нашем веке надо искать научно-обоснованный путь к лечению заболеваний человека с учетом взаимодействия микроорганизмов с организмом-хозяином. Для этого используют современный арсенал геномных, протеомных и метаболомных технологий. Исследования связаны с использованием сложных и дорогостоящих комбинированных инструментальных систем: лазерно-масс-спектрометрических, ПЦР в реальном времени в сочетании с времяпролетной масс-спектрометрией, даже приборы ядерного магнитного резонанса начали встраивать в аналогичные комбинации. Все это связано с пониманием необходимости развития некультуральных методов для изучения микробной экологии человека в комплексной связи с инфекцией, дисбиозом, влиянием антибиотиков, механизмом действия пробиотиков. Это должно привести к пониманию роли эндогенной микробиоты в различных заболеваниях внутренних органов и систем. Даже такие «не кишечные» заболевания, как ожирение, атопическая экзема и аутизм оказываются связанными с составом и активностью микробиоты (Chaucheyras-Durand and Durand, 2010).

Микробиота кишечника содержит дополнительный геном, состоящий из миллионов микробных генов – микробиом. Поскольку этот сложный симбиоз влияет на метаболизм, физиологию и экспрессию генов хозяина, возникло предположение, что человека надо рассматривать с общебиологических позиций как сложный биологический суперорганизм (Kinross et al., 2008). Автор ссылается на серию работ с участием Nicholson JK, руководителя хорошо оснащенной биохимической лаборатории в Имперском колледже (Лондон, Англия),

ядро которой составляют суперсовременные комбинированные приборы на основе ПЦР реального времени, различных вариантов масс-спектрометрии и ядерного магнитного резонанса. Аналогичное оборудование имеется в ряде американских и европейских стран, Японии, а также развивающихся стран, таких как Китай, Индия, Шри-Ланка. Под эгидой Nicholson JK эти центры опубликовали около тысячи научных работ за последнее десятилетие. Концепция Nicholson J.K. состоит в том, что состав микробиоты кишечника здоровых людей зависит от генотипа хозяина, диеты, возраста и пола и подвержена влиянию лекарственных препаратов (в особенности антибиотиков) (Nicholson J.K., 2005, 2006). Наблюдаемый метаболический фенотип человека в свою очередь сильно зависит от кишечного микробиома (Nicholson JK, 2005). Метаболические продукты хозяина и микробиоты неразрывно связаны, пересекаются и подвержены диэтическим вариациям. Для изучения этих взаимодействий и переплетений метаболизма необходимо понять какие из человеческих метаболических путей наиболее тесно связаны со структурными вариациями кишечной микробиоты. Состояние суперорганизма отражается в сумме метаболитов микробов и хозяина, которые выявляют по данным анализа крови и мочи. Для контроля состояния здоровья человека необходимо разобраться в происхождении, определить источник этих метаболитов в сложной экосистеме (Nicholson, 2003; Goodacre, 2006). Так возникла метаболомика, как метод функционального анализа, целью которого является получение надежной и воспроизводимой количественной информации о внутриклеточных и внеклеточных метаболитах. Она приобретает повышенный интерес в широком перечне дисциплин, включая функциональную геномику, интегральную и системную биологию, нутриционную геномику, фармакогеномику, а также поиск биомаркеров для прогноза заболеваний, их диагностики и терапевтического мониторинга (Goodacre, 2006).

По существу хроматография и ее сочетание с масс-спектрометрией уже давно применяется в этих целях. Но медленно, поскольку тема требует привлечения специалистов в области многих смежных наук: медицины, биохимии, микробиологии, аналитической и органической химии, генетики, иммунологии. А потенциал метода достаточен. Ряд авторов (D.White, L.Larsson, A.Fox, B.Szponar и другие), продемонстрированы положительные стороны этих методов в части универсальности и экспрессности, что удачно дополняет классические микробиологические методы контроля микроорганизмов в экологии, биотехнологии и медицине.

Анализ показывает также, что остается достаточное поле деятельности в области экспрессных исследований всего многообразия микроорганизмов в сообществах в едином цикле анализа с использованием специально сформированных банков данных химических профилей и маркеров. Необходима программа компьютерной обработки, позволяющая проводить оперативный мониторинг микробиоты окружающей среды, управление

биотехнологическими процессами, оперативную диагностику инфекционных процессов и мониторинг лечебных мероприятий. Отечественные работы последнего десятилетия показали возможность использования ГХ-МС микробных маркеров и метаболитов (метаболомики и микро-метаболомики в современной терминологии) в качестве новой медицинской технологии для рутинного клинического анализа (Osipov, 2011). То есть технология исследований есть, остается только «разобраться в происхождении, определить источник этих метаболитов в сложной экосистеме» - о чем пишут Nicholson и Goodacre.

Однако в последних работах группы Николсона прослеживается ориентация на исследование метаболизма методом протонного магнитного резонанса (ПМР). Это выглядит несколько неожиданно для применения ПМР, изначально ориентированного на структурные исследования индивидуальных органических веществ. Исследование смесей веществ на фоне сложной биологической матрицы – в моче - выглядит на сегодня проблематичным. Что и признают сами авторы в качестве проблем методологического характера: широкий диапазон концентраций веществ в реальной пробе, высокий уровень подобия большей части спектра разных проб, перекрывание спектров метаболитов, необходимость многочисленных тестирований, индивидуальной подбор пороговых значений сканирования (Chadeau-Hyam, 2010).

Предполагается, что в будущем метод способен дать новый инструмент в эпидемиологических исследованиях в поиске новых биомаркеров и диагностике заболеваний с целью обеспечения нового подхода в исследовании их этиологии, биологического механизма и метаболических путей. Однако для этого требуется оптимизация экспериментального протокола для обеспечения максимальной воспроизводимости, чувствительности и количественной адекватности метода при снижении аналитического дрейфа. Необходимо также разработать аппарат статистического моделирования для выявления биомаркеров при отслеживании ложно-положительных ассоциаций в сотнях и тысячах сложных спектрах метаболитов (Bictash, 2010).

Перспектива поставленных задач и масса публикаций по теме выглядит впечатляюще. Однако вызывает сомнение на сегодня сама теоретическая возможность «metabolome-wide association studies» - то есть широкого спектра метаболических ассоциаций (с заболеваниями, видимо). Дело в том, что метод ПМР основан на резонансном ответе молекулы на частоту колебаний модулирующего магнитного поля в объекте исследования, если она совпадает с частотой колебания конкретной межатомной связи в молекуле. То есть метод позволяет с высокой точностью фиксировать эти частоты. Поскольку частота колебаний связей зависит от типа соседних и ближайших атомов, то это дает инструмент структурных исследований чистых химических веществ. Анализ смесей веществ затруднен тем, что все они содержат одни и те же атомы C,H,N,O,S соединенные в подавляющем большенстве одной или двумя

химическими связями. Спектроскопия ПМР высокого разрешения позволяет выявить ближайшее атомарное окружение каждой связи и тем самым персонифицировать, отнести те или иные резонансные пики к конкретным молекулам. Насколько реально это сделать в совокупной пробе мочи, содержащей сотни аминокислот, моносахаров, жирных кислот, карбоновых кислот, их ассоциантов, полимеров и производных – вопрос будущих исследований.

Пока имеются примеры наблюдения отдельных реакций в организме человека на отдельные лекарственные препараты в особых случаях. Например, обнаружено, что у пациентов с высоким изначальным уровнем п-крезол-сульфата после приема ацетаминофена наблюдается низкое соотношение ацетаминофенсульфата к ацетаминофен-глюкорониду. Делается заключение, что у пациентов с высоким содержанием п-крезола бактериального происхождения, конкурентное О-сульфонирование п-крезола снижает эффективность системного сульфонирования ацетаминофена (Clayton, 2009).

Другой пример посвящен исследованию различий в составе жирных кислот, моносахаров и аминокислот в экстракте биоптатов тканей больных колоректальным раком (CRC) и здоровых людей уже при параллельном использовании ЯМР спектроскопии в виде HR-MAS NMR (спектроскопия высокого разрешения ЯМР вращения под магическим углом – твердофазный ЯМР) и газовой хроматографии – масс спектрометрии. В работе показано, что норма и патология CRC имеют отличия в составе этих веществ, причем масс-спектрометрия оказалась более информативной. Специфика изменений при CRC относительно других патологий толстой кишки не исследовалась и не обсуждается (Eric Chun Yong Chan, 2009).

Еще одна работа посвящена параллельному исследованию микробиоты фекалий членов китайской семьи в четырех поколениях (от 1,5 лет до 95 лет) методом двумерного гель-электрофореза и ПМР анализа метаболитов мочи в виде фингерпринта с частичной идентификацией членов микробиоты в фекалиях и метаболитов в моче. Корреляционные соотношения между десятью видами микроорганизмов и двадцатью метаболитами выглядит более чем приблизительно, так как трудно назвать их взаимно специфичными. Как демонстрация возможностей методов работа выглядит внушительно (Min Li, 2008). Однако результат носит чисто методический характер, поскольку метаболизм и состав микробиоты фекалий физиологически нельзя отождествлять с микробиотой пристеночного слоя кишечника и физиологией взаимодействия микроорганизмов кишечника и хозяина. Авторы констатируют существенные различия видового состава кишечной микробиоты у членов китайской семьи и отличие от микробиоты американцев. Можно согласиться с отличием микробиоты жителей Китая от жителей Америки – хотя бы по диетическим соображениям. Но разница в генетической линии мало вероятна по современным представлениям. Приходится сожалеть, что и в новейших высокотехнологичных исследованиях нового века сохраняется

распространенная подмена объекта: говорят о микробиоте кишечника, а исследуют микробиоту фекалий. Известно, что это заблуждение приводит в корелляционный тупик как только начинаются количественные сопоставление микробиоты и метаболизма фекалий со здоровьем пациента (Маянский, 1999).

Микроэкологический статус человека, точнее, поддержание его гомеостаза, является необходимым условием стабильного функционирования всех его органов и систем. Соответственно, одним из первых мероприятий по обеспечению качества и продолжительности жизни, а тем более в лечении любых заболеваний, особенно клинических отделениях реабилитации и интенсивной терапии, должен быть контроль и восстановление микробиоценоза, если он оказался нарушенным. В этом можно найти сходство во мнениях в современных публикациях (Осипов, 2007; Kinross, 2009; Федосова, 2010; Андрейцева, 2010). Микробиота человека сосредоточена в основном в кишечнике. Сведения о природе микробиоценоза кишечника, накопленные к настоящему времени, выглядят достаточными для понимания его функционирования, как физиологически активного органа человека. Однако для их реализации в управлении этим органом при патологиях, причинно-следственным образом связанных с дисбиозом, недостает количественного метода определения изменений в составе широкого круга ключевых микроорганизмов и их мониторинга в процессе коррекции. Причем желательно анализировать состав пристеночной кишечной микробиоты, а не микробиоты фекалий, как это принято повсеместно. Именно в мукозном слое, облегающем слизистую оболочку кишечника, происходит усвоение пищевого химуса, поступающего из желудка, синтез микроорганизмами большого числа биологически активных веществ: ферментов, витаминов, антибиотиков, иммуностимуляторов, но также и токсичных для человека веществ. Предполагается, что отсутствие баланса в их продукции связано с патологическими проявлениями самого разного характера: кишечными расстройствами, кожными заболеваниями, половой дисфункцией и сердечной недостаточностью.

Применение масс-спектрометрического метода дало возможность измерить численность более 50 таксонов микроорганизмов кишечника не только в фекалиях, но и в отделах самого кишечника, путем анализа их маркеров (жирных кислот) непосредственно в биоптатах, полученных при интестиноскопии и колоноскопии с ретроградной илеоскопией. Эти данные показывают, что там также доминируют эубактерии, а их видовой состав существенно меняется в зависимости от отдела. Следует отметить филогенетическое родство эубактерий и клостридий. В определителе Берджи 9-го издания (русский перевод) прямо сказано, что род эубактериум создан для удобства, чтобы поместить в него слабо спорообразующие клостридии. Если отметить еще известную и до сих пор не упорядоченную

гетерогенность обеих родов, то можно видеть, что кишечная микробиота представляет собой доминирующий континуум штаммов и видов родов Clostridium и Eubacterium в их сегодняшнем написании при равновеликом суммарном количестве бактероидов, бифидобактерий и лактобацилл. О том, что роды клостридий и эубактерий близки генетически свидетельствует отсутствие на сегодня специфичных зондов для каждого рода. Зонды, сконструированные для клостридий перекрестно определяют эубактерии и наоборот. Например, зонд, предложенный для определения группы новых клостридий во главе с C. coccoides (обнаружен в кишечнике в 1997г) включает в группу кроме эубактерий еще и руминококки.

Приведенные данные свидетельствуют о важности рода Eubacterium в формировании и функционировании кишечной микробиоты. Теперь уже трудно, после проведенного анализа филогенетических связей, оторвать его от рода Clostridium (по крайней мере группы C. coccoides) и рассматривать их как пищеварительно важную группу пептолитических и целлюлолитических организмов. Следует отметить принципиально важную особенность представителей рода Eubacterium, заключающуюся в способности образовывать водород. Это ключевое свойство консорциумов микроорганизмов, осуществляющих дайджест органического субстрата при анаэробных процессах в природе (болота), в рубце жвачных и в биотехнологии при анаэробном сбраживании разного рода отходов и получении биогаза. Мукозный слой кишечника человека по существу является аналогичным биореактором. Там идет образование метана, следовательно, работают архебактерии-метаногены, эффективность которых строго зависима от концентрации водорода в системе. В метаногенном сообществе водородные бактерии играют ключевую регуляторную роль еще и благодаря обратной связи процесса продукции и потребления водорода на первичный процесс расщепления углеводов с образованием ацетата. При СРК, как следует из наших измерений, наибольшие изменения претерпевает численность эубактерий, что должно приводить к увеличению концентрации водорода в системе. Действительно, ранее экспериментально показано четырехкратное увеличение концентрации водорода в выдыхаемом воздухе у больных с СРК (King, 1998) и его возвращение в норму при снятии симптомов в результате ограничительной диеты.

Актиномицеты превосходят все прочие микроорганизмы по продукции антибиотиков и витаминов и обладают мощным ферментативным аппаратом. Высокая степень колонизации кишечника актиномицетами не выглядит необычным явлением, если иметь в виду, что актиномицеты широко распространены в окружающей среде – почве, воде, воздухе, на внутренних стенах жилых и производственных помещений (Andersson, 1997). Их обитание в организме человека при таких обстоятельствах выглядит естественным. Действительно, в руководствах по клинической микробиологии отмечается обнаружение актиномицетов и родственных организмов, таких как Mycobacterium, Actinomadura, Propionibacterium,

Actinomyces, Corynebacterium, Bifidobacterium в кишечнике и других органах человека. Там они фигурируют (в том числе и бифидобактерии) как участники инфекционных и воспалительных процессов. Однако патогенность актиномицетов, чувствительность к антибиотикам, способы лечения связанных с ними заболеваний являются предметом единичных специализированных лабораторий и клиник в мире. Трудности в их бактериальной диагностике и культивировании послужили препятствием широкой известности этих микроорганизмов в клинической практике. В том числе при многочисленных заболеваниях, связанных с изменением микробиоты кишечника.

Современные исследования микробиоты кишечника культуральными и не культуральными методами в целом подтверждают наши измерения по методу МСММ. Они детально суммированы в недавно опубликованной монографии (Wilson, 2008). Данные анализа 16S-рРНК показывают, что 80% выявленных филотипов не находят соответствия известным видам культивируемых микроорганизмов. Полное число микробных генов в этом сообществе составляет от двух до четырех миллионов, то есть в 70-140 раз больше, чем в геноме хозяина, что свидетельствует о колоссальном метаболическом потенциале бактерий кишечника. По литературным данным наиболее часто из кишечника выделяют виды *Bacteroides, Eubacterium, Clostridium, Bifidobacterium, Streptococcus, Lactobacillus, Peptostreptococcus, Peptococcus, Ruminococcus, Fusobacterium, Veillonella, Enterococcus, Propionibacterium, Actinomyces, Desulfovibrio, Helicobacter, Porphyromonas, Prevotella, Escherichia, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Candida, Gemella,* и *Proteus,* что совпадает с перечнем доминирующих родов бактерий, определяемых методом МСММ в биоптатах отделов кишечника и фекалиях. Кроме того, отмечена значимость рода Clostridium, особенно *Cl. perfringens, Cl. ramosum, Cl. innocuum, Cl. paraputrificum, Cl. sporogenes, Cl. tertium, Cl. bifermentans, Cl. tetany* and *Cl. butyricum,* которые наиболее часто присутствуют в изолятах кишечного тракта и могут быть вовлечены в полимикробные инфекции при перитоните, интраабдоминальной инфекции и септицемии, а также при патологиях центральной нервной системы. Это также подтверждает наши могочисленные клинические случаи участия и доминирования клостридий в воспалениях различных органов и гнойно-септических процессах.

Сопоставлять данные МСММ по составу кишечной микробиоты с результатами измерений другими методами чрезвычайно проблематично. Каждый имеет свои ограничения. Культуральный метод ограничен возможностями лаборатории в культивировании широкого круга кишечных микроорганизмов, количественные данные представляются как правило в виде частоты высевания микроба, или колоний образующих единиц (КОЕ) на чашке Петри, что далеко не адекватно биомассе микробов в месте обитания. Данные генетического метода индивидуальны по набору таксонов или групп микроорганизмов вследствие различия

возможностей лабораторий в подборе праймеров для анализа. Каждый исследователь должен заранее предположить, что он ожидает найти в сообществе микроорганизмов и что он может в данный момент определить исходя из набора тестовых материалов. Количественные измерения так же, как и в культуральном методе, адекватны не биомассе микробов, а проценту выявляемых клонов. В книге Wilson убедительно показано на серии исследования микробиоты пищевода, всех отделов кишечника и фекалий что данные культурального и молекулярно – генетического метода существенно отличаются на порядки величин по количественным определениям одних и тех же таксонов бактерий, а также по составу и рейтинговому положению. Эти методы можно использовать лишь для сопоставительных анализов внутри отдельной лаборатории. На самом деле при изучении и сопоставлении данных разных лабораторий надо четко уяснить: количество чего измеряет данный метод. Это может быть частота высеваемости какого-либо вида при использовании культуральных методов, или число фенотипов или клонов при генетических исследованиях. Эти данные никак не отражают численность микроорганизмов в сообществе и их рейтинговое количество. Поэтому нельзя их в таком виде использовать для решения задач в области общебиологических взаимодействий в суперорганизме, пока они не приобрели количественный характер. До тех пор – это фундаментальные исследования на стадии отработки методики без выхода на корелляционные соотношения в микробиома с метаболомом и протеомом между собой, а тем более с клиническими проявлениями, действием лекарственных средств и пробиотиков – всем тем, чем сейчас озабочено передовое научное сообщество в изучении микроэкологии человека в норме и патологии.

Метод МСММ, напротив, адекватен напрямую численности (биомассе) микроорганизмов в месте обитания – например, в боптате кишечника или фекалиях, а также в ткани любого другого инфицированного органа, поскольку концентрация химического маркера из состава клеточной стенки микроорганизма прямо пропорциональна численности микроорганизмов в пробе. Причем в одном и том же приборе ГХ-МС выполняются анализы по микобиому и метаболому. Поэтому он пригоден как для фудаментальных, так и для рутинных клинических исследований и мониторинга лечебных мероприятий.

Остановимся на осмыслении полученных аналитических данных по концентрации микробных маркеров в стенке кишечника и в крови. Важным результатом является качественное соответствие состава минорных ЖК и стеролов в этих органах. Еще более важна количественная адекватность изменений их концентраций в тонкой кишке и в крови. Это означает, как уже отмечалось, возможность неинвазивной оценки изменений микробиоты кишечника по данным анализа крови методом ГХ-МС микробных маркеров.

Наличие маркеров микроорганизмов в крови теоретически обусловлено механизмом иммунного ответа на появление возбудителя. Фагоцитирующие клетки организма человека

адсорбируют и переваривают антигены микроорганизмов, в том числе и целые клетки, и выводят продукты лизиса в поток лимфатической и кровеносной систем. Можно представить, что поток лимфы, постоянно омывающий ткани, стенки кишечника и эпителий “ворот” инфекции, забирает антиген возбудителей хронической или острой инфекции. Сывороточные белки передают компоненты антигена фагоцитам, где запускается известный механизм по уничтожению антигена и пораженных клеток макроорганизма и выработка антител для последующих актов иммунной реакции. Важно, что компоненты микробных клеток попадают в кровь и могут быть определены в ней чувствительным аналитическим методом, каковым является метод ГХ-МС в режиме фрагментных ионов. Не следует считать, что в крови присутствуют активные микробные клетки. Известно, что посев крови на питательные среды дает обычно отрицательный результат, роста микробов не происходит, за исключение случаев бактериемии. Кроме фагоцитоза, клетки микроорганизмов разрушаются под действием других механизмов, в том числе собственного автолиза клеток и лизиса ферментами белкового комплемента крови и других компонентов иммунной защиты. В любом случае разрушение происходит в конечном счете до мономерных составляющих биополимеров. Исходя из основ физиологии обмена биологических жидкостей человека, обмен 70% жидкости плазмы с интерстиционным пространством происходит за 1 мин. Поэтому малые фрагменты микробных биополимеров, образующиеся в этом пространстве, поступают в кровь практически сразу. Если учесть, что большая часть фагоцитирующих клеток крови (фагоциты) находится за пределами сосудистого русла, в межклеточном пространстве и свободно проходит стенки сосудов, то можно полагать, что независимо от очага воспаления микробные маркеры постоянно и быстро поступают в кровь вместе с фагоцитами и белками переносчиками. То есть наличие микробных маркеров в крови отражает состав микробных сообществ тела человека, независимо от места обитания микроорганизмов или очага воспаления. Однако и в норме, то есть при отсутствии симптомов воспаления или локального инфицирования, концентрация микробных маркеров в крови остается достаточно высокой, что до сих пор не находило разумного объяснения. Полученные количественные данные о концентрации микроорганизмов на стенке кишечника с очевидностью свидетельствуют о том, что их преимущественным источником является микробиота кишечника.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ардатская М.Д. Дисбактериоз кишечника: понятие, диагностические подходы и пути коррекции. Возможности и преимущества биохимического исследования кала / М.Д.

Ардатская, О.Н. Минушкин, Н.С. Иконников // Пособие для врачей. – М., 2004. – С. 28–34.

2. Арутюнов Г.А. Биоценоз кишечника и сердечно–сосудистый континуум / Г.А. Арутюнов, Л.И. Кафарская, В.К. Власенко и др. // Сердечная недостаточность. – 2004. – Т.5, № 5. – С. 224–229.
3. Барышникова Н.В. Клинико–микробиологическая характеристика микробиоценоза кишечника и коррекция его нарушений у больных хроническим гастродуоденитом, ассоциированным с Helicobacter pylori.: Автореф. дис. … канд. мед. наук / Н.В. Барышникова. – СПб., 2006. – 24 с.
4. Белобородова Н.В., Осипов Г.А. Гомеостаз малых молекул микробного происхождения и его роль во взаимоотношениях микроорганизмов с хозяином. Вестник РАМН. -1999. Т.16, -№7, с. 25-31.
5. Белоусова Е.А. Синдром избыточного бактериального роста в тонкой кишке в свете общей концепции о дисбактериозе кишечника: взгляд на проблему / Е.А. Белоусова // Фарматека. – М., 2009. – №2. – С. 10–11.
6. Бондаренко В.М. Препараты пробиотики, пребиотики и синбиотикив терапии и профилактике кишечных дисбактериозов / В.М. Бондаренко, Н.М. Грачева // Фарматека. – М., 2003. – № 7. – С. 56–63.
7. Бурова С.А. Особенности течения и терапии грибковых инфекций у детей / С.А. Бурова // Доктор. Ру. – 2003 (декабрь). – С. 24–25.
8. Википедия: http://ru.wikipedia.org/wiki/Синдром_хронической_усталости
9. Григорьев П.Я. Нарушение нормального состава кишечной микрофлоры, клиническое значение и вопросы терапии (методическое пособие) / П.Я. Григорьев, Э.П. Яковенко. – М, 2000. – 16 с.
10. Гриневич В.Б. Клинические аспекты диагностики и лечения дисбиоза кишечника в общетерапевтической практике / В.Б. Гриневич, Ю.П. Успенский, В.М. Добрынин и др.: Учебно–методическое пособие – СПб.: Валмед, 2002. – 35 с.
11. Данилова О.П. Дисбактериоз (дисбиоценоз) кишечника – клинико–инструментальный диагноз / О.П. Данилова // Медицинская экология и клиническая медицина: предпосылки и пути интеграции: Материалы XXXIV научной конференции СПбМАПО «Хлопинские чтения» / Под. ред. А.П. Щербо. – СПб.: СПбМАПО, 2001. – С. 105–111.
12. Дьяченко И.А, Осипов Г.А., Архипова А, Захарова Л, Мурашев А.Н. Изучение влияния ампициллина на микробиоту кишечника у крыс методом газовой хроматографии – масс спектрометрии по маркерным веществам в крови. Третья международная конференция из серии "Наука и бизнес" 19 - 21 июня 2006 г., Пущино.

13. Захарченко М.М. Диагностика и коррекция нарушений кишечного микробиоценоза у больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки неосложненного течения: Автореф. дис. … канд. мед. наук / М.М. Захарченко. – СПб, 2003. – 24 с.
14. Ипатова М.Г., Шумилов П.В., Осипов Г.А., Ястребова Н.Е., Бобрышева В.О., Цимбалова Е.Г., Щиголева Н.Е. Особенности пристеночной микробиоты при воспалительных заболеваниях кишечника у детей. Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. 2009, № 4, М16.
15. Клиническое значение метода хромато-масс-спектрометрии при дерматитах. Учебно-методическое пособие для системы последипломного образования врачей. Утверждено ЦКМС с ГОУ ВПО РГМУ Росздрава. Москва 2011. 60с
16. Козлова Д.И. Состояние кишечного микробиоценоза и течение H. pylori–ассоциированного гастрита в условиях эрадикационной и синбиотической терапии: Автореф. дис. … канд. мед. наук / Д.И. Козлова. – СПб, 2004. – 21 с.
17. Крымцева Т.А., Осипов Г.А., Бойко Н.Б., Соколов Я.А., Демина А.М., Радюшина Т.В., Осипов Д.Г.. Минорные жирные кислоты биологических жидкостей урогенитальных органов и их значимость в диагностике воспалительных процессов. Журн. Микроб. Эпидем. Иммун. 2003, № 2: 92-101.
18. Кцоян Ж.А., Н.В.Белобородова, Г.А.Осипов, Н.Н.Саркисян, К.Г.Карагезян. Спектр и уровень содержания низкомолекулярных соединений микробного происхождения при периодической болезни. Вестник РАМН, №2, с.41-45, 2002.
19. Малахова Н.С., Пичугин А. В., Халиф И.Л., Атауллаханов Р.И. Применение иммуномодулятора Гепон для лечения неспецифического язвенного колита Фарматека, 2005, № 6, с.105-108
20. Международная классификация болезней (МКБ)–10.
21. Минушкин О.Н. Дисбактериоз кишечника / О.Н. Минушкин, М.Д. Ардатская, В.Н. Бабин и др. // Рос. медицинский журнал. – 1999. – № 3. – С. 13–15.
22. Митрука Б.М. Применение газовой хроматографии в микробиологии и медицине. М. Медицина, 1978.
23. Михайлова Д.О., Бобылева З.Д., Базарный В.В., Амон Е.П., Бейкин Я.Б., Беседина Л.Т., Мельникова О.В., Шилова В.П., Розанова С.М., Перевалова Е.Ю. Диагностическое значение различных иммунологических методов лабораторной диагностики легионеллеза.// Журн. микробиол., эпидемиол. иммунобиол., 2008; № 2, с. 51-53.

24. Мубаракшина О.А. Избыточный бактериальный рост в кишечнике: особенности патогенеза и фармакотерапии / О.А. Мубаракшина // Мед. вестник. – 2008. – № 19. – С. 446.
25. Назаретян В.Г. Кишечный дисбиоз при хроническом гастродуодените у детей и его коррекция: Автореф. дис. …на соиск. степ. д–ра. мед. наук / В.Г. Назаретян. – М., 2005.
26. Новикова В.П., Гурова М.М., Цех О.М. Комплексное лечение с использованием пробиотиков на основе лактобактерий у детей с хроническим гастродуоденитом в стадии ремиссии/ Комитет по здравоохранению администрации Санкт–Петербурга. – СПб., 2011. – 24с.
27. Новикова В.П., Цех О.М., Бурцева Т.И. и др. Состояние пристеночной микрофлоры тонкой кишки при запорах у детей раннего возраста/ Материалы XIX Конгресса детских гастроэнтерологов России и стран СНГ. Актуальные проблемы абдоминальной патологии у детей. – Москва, 2012. – С.217-218
28. Новикова В.П., Цех О.М., Гурьева В.А. и др. Динамика состояния микрофлоры тонкой кишки у детей на фоне лечения лямблиоза/ Материалы XIX Конгресса детских гастроэнтерологов России и стран СНГ. Актуальные проблемы абдоминальной патологии у детей. – Москва, 2012. – С.282-283
29. Осипов Г.А, Федосова Н.Ф., Лядов К.В. Количественный in situ микробиологический анализ по липидным маркерам в биологических жидкостях с использованием метода газовой хроматографии – масс спектрометрии. Здравоохранение и медицинские технологии № 5,- 2007 С. 20-23.
30. Осипов Г.А. Демина А.М. Хромато-масс-спектрометрическое обнаружение микроорганизмов в анаэробных инфекционных процессах. Вестник РАМН. -1996. Т.13, №2, С.52-59.
31. Осипов Г.А., Парфенов А.И., Верховцева Н.В., Ручкина И.Н., Курчавов В.А., Бойко Н.Б., Рогатина Е.Л. Клиническое значение исследования микроорганизмов слизистой оболочки кишечника культурально-биохимическим и хромато-масс-спектрометрическим методами. Эксп. Клин. Гастроэнтерология, 2003; (4): С. 59-67.
32. Осипов Г.А., Парфенов А.И., Ручкина И.Н. Висмута трикалия дицитрат в лечении больных постинфекционным синдромом раздраженного кишечника. Русский медицинский журнал http://www.rmj.ru/articles_5556.htm

33. Осипов, Г.А. Хромато-масс-спектрометрический анализ микроорганизмов и их сообществ в клинических пробах при инфекциях и дисбиозах. / Химический анализ в медицинской диагностике.- М.: Наука, 2010.- С.293-368.

34. Оценка микроэкологического статуса человека методом хромато-масс-спектрометрии. Новая медицинская технология. Зарегистрировано в Росздравнадзоре за № НЮ-40006 от 17.08.2009 г.

35. Парфенов А.И., И.Н.Ручкина, Г.А.Осипов. Антибиотикоассоциированная диарея и псевдомембранозный колит. Болезни кишечника, Том 04,-N 6,-2002

36. Парфенов А.И., И.Н.Ручкина, Г.А.Осипов. Коррекция микрофлоры кишечника пробиотиками у больных антибиотико-ассоциированной диареей. Consilium Medicum, Справочник поликлинического врача. Том 04,-N2,-2006 http://www.consilium-medicum.com/magazines/polik/handbook/article/9919

37. Парфенов А.И., Ручкина И.Н. Активатор местного иммунитета Гепон в комплексной терапии дисбиотических нарушений кишечника // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2003. № 3. С. 66-69

38. Пасечников В.Д. Морфофункциональные проявления атрофии слизистой оболочки желудка при Helicobacter pylori – ассоциированном гастрите / В.Д. Пасечников, С.М. Котелевец, С.З. Чуков, А.Н. Мостовов // Рос. журнал гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. – 2004. – № 1. – С.26–32.

39. Полеско И.В., Бутов Ю.С., Осипов Г.А., Кабаева Т.И., Парфенов В.В., Деленян Н.В. Состав кожного сала, микроэкология кожи и кишечника у больных себорейным дерматитом и акне (исследование методом газовой хроматографии масс-спектрометрии). Рос. журн. кож. и вен. бол. -2007, № 2, с.43-50.

40. Ткаченко Е.И. Дисбиоз кишечника. Руководство по диагностике и лечению. Под редакцией Е.И. Ткаченко и А.Н. Суворова. – Спб. ИнформМед, 2009.

41. Ткаченко Е.И. Питание, микробиоценоз и интеллект человека / Е.И. Ткаченко, Ю.П. Успенский, – СПб.: СпецЛит, 2006. – 590с.

42. Турова Е.С., Осипов Г.А. Изучение структуры микробного сообщества, активного в биотрансформации минералов железа в каолине. Микробиология, 1996, 65(5), 682-689.

43. Урсова Н.И. Современные технологии в коррекции дисбактериозов у де–
тей: Учеб. Пособие / Н.И. Урсова. – М., 2003. – С. 83.

44. Федосова Н.Ф., Лядов К.В., Осипов Г.А Новые подходы к анализу инфекционных послеоперационных и посттравматических осложнений, Инфекции в хирургии, Том 8, 2010 г., №2- С.56-62.

45. Шевяков М.А. Характер нарушений интестинального микробиоценоза у пациентов с синдромом раздраженного кишечника / М.А. Шевяков, З.К. Колб, О.Г. Савельева, Ю.В. Борзова (Тез. докладов на 6 научно–практической конференции по медицинской микологии (6 Кашкинские чтения) // Проблемы медицинской микологии. – 2003. – Т.5, №2. – С. 43–44.

46. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. В 3-х томах. Том 1.; Микрофлора человека и животных и ее функции. Стр 14-17. М., Грант, 1998.

47. Alexander C. J., Citron D.M., Brazier J.S., AND Goldstein E.J.C., Identification and Antimicrobial Resistance Patterns of Clinical Isolates of *Clostridium clostridioforme*, *Clostridium innocuum*, and *Clostridium ramosum* Compared with Those of Clinical Isolates of *Clostridium perfringens*. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Dec. 1995, Vol. 33, No. 12 p. 3209–3215

48. Andersson MA, M Nikulin, U Koljalg, MC Andersson, F Rainey, K Reijula, EL Hintikka, and M Salkinoja-Salonen. Bacteria, molds, and toxins in water-damaged building materials. Appl. Envir. Microbiol., Feb 1997; 63: 387 - 393.

49. Beloborodova N.V., Osipov G.A. // Small molecules originating from microbes (SMOM) and their role in microbes-host relationship.// Microb. Ecol.Heal.Dis., SCUP. - 2000.- Vol. 12. – P. 12-21.

50. Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology.// Baltimore,London.- Wilians&Wilkins.- 1984

51. Bolte E.R. Autism and Clostridium tetani. Med Hypotheses, August 1, 1998; 51(2): 133-44

52. Bures J. Small intestinal bacterial overgrowth syndrome / Bures Jan, Cyrany Jiri, Kohoutova Darina, Förstl Miroslav, et all. // World J. Gastroenterol. – 2010, June 28. – Vol. 16, N24. – P. 2978–2990.

53. Castiglione F. Orocecal transit time and bacterial overgrowth in patients with Cron’s disease / F. Castiglione, Blanco G. Del Vecchio, A. Rispo, et al. // J Clin. Gastroenterol. – 2000. – Vol. 31. – P. 63–66.

54. Chemical Methods in Bacterial Systematics (1985) (Goodfellow, M. and Minnikin, D.E., Eds.), Acad. Press, London – Toronto

55. Ciancio G. Regression of duodenal gastric metaplasia in Helicobacter pylori positive patients with duodenal ulcer disease / G. Ciancio, M. Nuti, B. Orsini, F. Iovi, M. Ortolani, A. Palomba, et al. // Dig Liver Dis. – 2002. – Vol.34. – P. 16–21.

56. Fenollar F., Roux V., Stein A., Drancourt M., Raoult D. Analysis of 525 samples to determine the usefulness of PCR amplification and sequencing of the 16S rRNA gene for diagnosis of bone and joint infections.// J. Clin. Microbiol., 2006, Vol. 44, № 3, p. 1018-1028.

57. Forchielli M.L. The role of gut associated lymphoid tissue and mucosal defence / M.L. Forchielli, W.A. Walker // Br. J. Nutr. – 2005. – Vol. 93, suppl. 1. – P. S41–48.

58. Giannella R.A. Jejunal brush border injury and impaired sugar and amino acid uptake in the blind loop syndrome / R.A. Giannella.A., W.R. Rout, P.P. Toskes // Gastroenterology. – 1974. – Vol. 67. – P. 965–974.

59. Gibson G.R. Human colonic bacteria: role in nutrition, physiolody and pathology / G.R. Gibson, G.T. Macbarlane // Boca Ratoh: CRC Press. – 1995. – P.250.

60. Goldstein E. J. C., Citron D. M., C. V. Merriam, Y. Warren, K. L. Tyrrel. Comparative In Vitro Activities of Ertapenem (MK-0826) against 1,001 Anaerobes Isolated from Human Intra-Abdominal Infections. Antimicr.Agents.Chemoter., Sept. 2000, p. 2389–2394

61. In Vitro Activities of Ramoplanin, Teicoplanin, Vancomycin, Linezolid, Bacitracin, and Four Other Antimicrobials against Intestinal Anaerobic Bacteria. Antimicr.Agents.Chemoter., July 2003, p. 2334–2338 Vol. 47, No. 7

62. J.Clin.Microbiol., Dec. 1995, p. 3209–3215 Vol. 33, No. 12)

63. Kinross, J.M. von Roon, A.C., Holmes, E., Darzi, A., Nicholson, J.K. The human gut microbiom: implication for future health care. Current Gastroenterology Reports 2008, 10: 396-403

64. Linder R. *Rhodococcus equi* and *Arcanobacterium haemolyticum*: Two “Coryneform” Bacteria Increasingly Recognized as Agents of Human Infection. Emerging Infectious Diseases Vol. 3, No. 2, April–June 1997

65. Manual of Clinical Microbiology. 5-th ed. Editor in Chief - Albert Balows. Washington, 1991

66. McNeil M.M., Brown J.M., Jarvis W.R., Ajello L. Comparison of species distribution and antimicrobial susceptibility of aerobic actinomycetes from clinical specimens. Rev Infect Dis. 1990 Sep-Oct;12(5):778-83

67. Nicholson J.K., Holmes E., Wilson I.D. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. Nat Rev Microbiol. 2005; 3:431–438.

68. Nissle A. Uber die Grundlagen einer e neuen ursachlichen Bekampfung der pathologishen Darmflora / A. Nissle // Dtsch. Med. Wschr. – 1916. – Dl. 42. – S. 1181–1184.

69. Osipov G. A. and Verkhovtseva N. V. Study of human microecology by mass spectrometry of microbial markers. Beneficial Microbes. Volume 2, Number 1 / March 2011 p63-78

70. Osipov G.A., Turova E.S. Studying species composition of microbial communities with the use of gas chromatography-mass spectrometry. Microbial community of kaolin. FEMS Microbiol.Rev. – 1997. - Vol. 20. - P. 437-446.

71. Oumi M. A scanning electron microscope study on the effects of different bile salts on the epithelial lining of jejunal mucosa / M. Oumi, T. Yamamoto // Med. Electron. Microsc. – 2000. – Vol. 33. – P. 11–15.

72. Ouwehand A. The role of intestinal microflora for the development of the immune system in early childhood / A. Ouwehand, E. Isolauri, S. Salminen // Eur J. Nutr. – 2002. – suppl. 1. – P. 32–37.

73. Paul J. Small Intestinal Bacterial Overgrowth: Histopathologic Features and Clinical Correlates in an Underrecognized Entity / J. Lappinga Paul, C. Abraham Susan, A. Murray Joseph. Murray, A. Emily // Archives of Pathology & Laboratory Medicine: February 2010. – Vol. 134, N2. – P. 264–270.

74. Pawlik B. Presence of fungi in stool of children / B. Pawlik, A.B. Macura, J. BialekKaleta // Med Dosw. Microbiol. – 2002. – Vol. 54, N3. – P. 2739.

75. Persing D.H. Polymerase chain reaction: trenches to benches.// J. Clin. Microbiol., 1991, Vol. 29, № 7, p. 1281-1285.

76. Pimentel M. Methane, a gas produced by enteric bacteria, slows intestinal transit and augments small intestinal contractile activity / M. Pimentel, H.C. Lin, P. Enayati, et al. // Am J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 2006. – Vol. 290. – P. 1089–95.

77. Sheu B.S. Lactobacillus and Bifidobacteria containing yogurt can improve the drug compliance of triple therapy for Helicobacter pylori eradication / B.S. Sheu, J.J. Wu, C.Y. Lo, et al. //Aliment Pharmacol Ther. – 2002. – Vol. 16. – P. 1669–75.

78. Stead, D.E., Sellwood, J.E., Wilson, J., Viney, J. Evaluation of a commercial microbial identification system based on fatty acid profiles for rapid, accurate identification of plant pathogenic bacteria. J.Appl.Bacteriol. 1992, 72, 315-321.

79. Toskes P.P. Enteric bacterial flora and bacterial overgrowth. In: Sleisinger & Fortrand’s Gastrointestinal Diseases, Fifth Edition / P.P. Toskes, R.M. Donaldson (Eds., M. Feldman, B.F. Scharschmitt, M.H. Sleisinger. – 1993. – P, 1106–1117.