

Масс-спектрометрия микробных маркеров в синовиальной жидкости при травмах и артритах коленного сустава

Г.Г. Родионов, А.А. Ветошкин

Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург

Применение масс-спектрометрии микробных маркеров (МСММ) для диагностики скрытой инфекции при патологии суставов дает качественно новый вариант микробиологического исследования благодаря возможности одновременного количественного определения более сотни микробных маркеров непосредственно в пробе без предварительного культивирования микроорганизмов и использования биохимических тестовых материалов и генетических праймеров. Получение в реальном времени расширенной информации об анаэробах и трудно культивируемых аэробах, а также актинобактериях, вирусах, дрожжах и микроскопических грибах из одной пробы обеспечивает полное понимание микробной этиологии заболевания.

Ключевые слова: травма, артрит, масс-спектрометрия, микробные маркеры, микробиота, микроорганизмы, инфекция.

Введение

В настоящее время неуклонно растет число больных с хирургической патологией суставов конечностей, и частота этой патологии колеблется от 30 до 55 % среди всех ортопедических заболеваний [1]. Коррекционные операции на этих суставах обеспечивают улучшение качества жизни данной категории больных [2]. Однако инфекционные осложнения, которые развиваются в 10–30% после операций на суставах с использованием имплантатов, приводят во многих случаях к тяжелым ортопедическим дефектам [3, 4]. Причины послеоперационных осложнений связаны не только с асептической природой, но и с микробной этиологией.

Также, в последние годы, прослеживается тенденция к увеличению количества больных с реактивным артритом. Данная патология считается одной из самых распространенных форм реактивных артритов у людей в возрасте от 20 до 40 лет [5–7]. Поздняя диагностика заболевания, неполноценное и нерациональное лечение на начальных этапах могут вести к развитию крайне тяжелых форм с затяжным течением, которые в ряде случаев приводят к инвалидизации [8]. Частота инвалидизации колеблется от 0,9% до 26,0% [9]. По современным представлениям, реактивный артрит возникает у людей с генетической предрасположенностью и относится к числу мультифакториальных заболеваний со сложным патогенезом [10]. Многие исследователи объясняют патогенез заболевания аллергической реакцией организма на воздействие, как микробного антигена, так и других белковых и токсических веществ.

Целью данной работы является совершенствование методик диагностики инфекционных возбудителей реактивного артрита и улучшение качества предоперационной диагностики скрытой внутрисуставной инфекции для эффективной предоперационной санации и последующего мониторинга течения заболевания.

Материал и методы исследования

Обследовано 42 человека с патологией коленных суставов, которые находились на лечении в клинике № 2 ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России. Средний возраст пациентов составил $35,0 \pm 10,5$ лет. Соотношение женщин и мужчин – 1:3. На основании анамнеза, клинических, лабораторных и инструментальных исследований все обследованные лица были разделены на две группы.

Первую группу (n=22) составили больные с острой травматической патологией коленных суставов. Вторую группу (n=20) составили больные с наличием суставного симптомокомплекса реактивного артрита.

В работу не включались лица с клиническими проявлениями и наличием лабораторных маркеров ВИЧ 1 и 2 типов, вирусных гепатитов В и С, сифилиса, туберкулеза, ревматоидного артрита, подагры, болезни Бехтерева, псориаза, с обострением соматических патологий не относящихся к исследованию. Обследование пациентов проводили по единой схеме.

Для анализа синовиальную жидкость (СЖ), полученную из коленного сустава в количестве 40 мкл пипеткой переносили в виал (емкостью 1,5 мл с завинчивающейся крышкой с тефлонированной прокладкой), подсушивали (при снятой крышке) в термостате при 80 °С с добавлением 40 мкл метанола для ускорения сушки. К загустевшей пробе приливали 400 мкл 1М соляной кислоты в метаноле, плотно завинчивали крышкой и подвергали кислому метанолизу при 80 °С в течение 1 часа. К охлажденной реакционной среде добавляли 300 нг стандарта (дейтерометилловый эфир тридекановой кислоты), растворенного в гексане. Затем проводили экстракцию двумя порциями по 200 мкл гексана, встряхивая смесь на вортексе и позволяя ей отстояться в течение 5 мин при комнатной температуре. Объединенный экстракт переносили в чистый виал, высушивали 5–7 мин при 80 °С и сухой остаток обрабатывали 20 мкл N,O-бис(триметилсилил)-трифто-

рацетамида, в течение 15 мин при 80 °С при закрытой крышке. К реакционной смеси добавляли 80 мкл гексана и в таком виде проба пригодна для анализа в течение недели, если она герметично закрыта и не происходит ее испарения.

Для проведения анализа смесь эфиров в количестве 2 мкл вводили в инжектор газового хроматографа «Agilent 7890» с масс-селективным детектором «Agilent 5975С» (Agilent Technologies, США) посредством автоматической системы ввода проб (автосэмплер), которая обеспечивает воспроизводимость времен удерживания хроматографических пиков и повышает точность автоматической обработки данных. Хроматографическое разделение пробы осуществляли на капиллярной колонке с метилсиликоновой привитой фазой HP-5ms (Agilent Technologies, США) 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 °С. Выдержка при начальной температуре 1,5 мин. Температура испарителя – 250 °С, интерфейса – 250–300 °С.

В качестве сравнения нами были обследованы 110 проб цельной крови, по изложенной выше методике (60 женщин и 50 мужчин), практически здоровых специалистов ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никитова МЧС России среднего возраста 40±5,7 лет.

Метод около пятнадцати лет проходил апробацию в медицинских учреждениях Москвы, а в 2010 г. Росздравнадзором разрешено его применение в качестве новой медицинской технологии «Оценки микробиологического статуса человека методом хромато-масс-спектрометрии» на территории Российской Федерации (Разрешение ФС 2010/038 от 24.02.2010). Авторы медицинской технологии: академик РАМН Баранов В.М., д.б.н. Осипов Г.А., д.м.н. Мухамедиева Л.Н., д.м.н. проф. Белобородова Н.В., Пахомова А.А., д.м.н. Ильин В.К. и к.б.н. Родионова Т.А.

Результаты и их анализ

Как показывает предварительный анализ экспериментальных измерений – выявлять агент воспаления при артритах следует не только по абсолютному превышению расчетной численности микроорганизмов в суставе (по 47 маркерам в СЖ) по сравнению с фоном микробиологического статуса (по 57 маркерам в крови), но и по соответствующим относительным изменениям.

Так, при травме коленного сустава по сравнению с микробными маркерами в крови (табл.) выявлялось появление в СЖ микробных маркеров *Peptostreptococcus anaerobius*, *Propionibacterium*, *Propionibacterium acnes*, *Eubacterium moniliforme* sbsp, *Blautia coccoides* и увеличение концентрации микробных маркеров *Streptococcus* (оральные) в 2 раза, *Nocardia* в 3,2 раза, *Actinomyces* в 3,3 раза, *Prevotella* в 1,7 раза. При этом у большинства микробных маркеров (*Eubacterium lentum* (группа А), *Clostridium propionicum*, *Актиномицеты*, *Pseudonocardia*, *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Corineform CDC-group XX*, *Lactobacillus*, *Campylobacter mucosalis*, *Cl.difficile*, *Eubacterium/Cl.*

Coccoides, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium/Cl. Subterminale*, *Streptococcus mutans* (анаэробные), *Herpes*, Цитомегаловирус, *Nocardia asteroides*, Микр грибы (кампестерол и ситостерол), *Actinomycetes 10Me14*, *Actinomyces viscosus*) отмечалось снижение их концентрации в 1,5–23 раза, а *Candida* в 129 раз.

При артрите коленного сустава по сравнению с микробными маркерами в крови (табл.) наблюдалось появление в СЖ микробных маркеров *Peptostreptococcus anaerobius*, *Propionibacterium*, сем. *Enterobacteriaceae* (*E.coli* и пр.), *Propionibacterium acnes*, *Blautia coccoides* и увеличение концентрации микробных маркеров *Streptococcus* (оральные) и *Nocardia* в 2,6 раза, *Prevotella* в 3,2 раза, *Streptomyces* в 2 раза, *Clostridium ramosum* в 1,6 раза. При этом также как и в группе с травмой коленного сустава у большинства микробных маркеров (*Eubacterium lentum* (группа А), *Clostridium propionicum*, *Актиномицеты*, *Pseudonocardia*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus intermedius*, *Corineform CDC-group XX*, *Lactobacillus*, *Campylobacter mucosalis*, *Candida*, *Cl.difficile*, *Eubacterium/Cl. Coccoides*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium/Cl. Subterminale*, *Streptococcus mutans* (анаэробные), *Herpes*, Цитомегаловирус, *Nocardia asteroides*, Микр грибы, кампестерол и ситостерол, *Actinomycetes 10Me14*, *Actinomyces viscosus*) отмечалось снижение их концентрации в 1,5–28 раз, а Микр грибы (ситостерол) в 110 раз.

Необходимо отметить, что по сравнению с микробными маркерами в крови общее количество микробных маркеров в СЖ в группе с травмой коленного сустава было снижено в 2,5 раза, а в группе с артритом – в 1,7 раза. Обращает на себя внимание и отсутствие в указанных группах микробных маркеров *Enterococcus*, *Eubacterium*, *Clostridium perfringens* и *Achromobacter*.

При сравнении концентрации микробных маркеров в СЖ группы с артритом по сравнению с группой пациентов с травмой коленного сустава выявлялось увеличение таких микробных маркеров как *Eubacterium lentum* (группа А), *Peptostreptococcus anaerobius*, *Streptomyces*, *Corineform CDC-group XX*, *Prevotella*, *Eubacterium/Cl. Coccoides*, *Propionibacterium acnes*, Цитомегаловирус, *Actinomycetes 10Me14*, *Actinomyces viscosus*, *Clostridium ramosum* в 1,5–4,7 раза, а *Propionibacterium* и *Candida* в 16,8 раз и 17,4 раза, соответственно (рис. 1 и 2). В тоже время отмечалось появление в СЖ микробных маркеров *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus*, *Propionibacterium jensenii*, *Peptostreptococcus anaerobius 2*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, сем. *Enterobacteriaceae* (*E.coli* и пр.). При этом общее количество микробных маркеров в группе с артритом коленного сустава было увеличено в 1,5 раза (рис. 2).

Обращает на себя внимание и снижение концентрации таких микробных маркеров как *Bifidobacterium*, *Nocardia*, *Nocardia asteroides*, *Pseudonocardia*, Микр грибы (ситостерол), *Blautia coccoides* в 1,5–4,7 раза (рис. 3 и 4).

При травме коленного сустава в СЖ обнаруживались микробные маркеры *Eubacterium moniliforme* sbsp, *Actinomyces* и Микр грибы (кампестерол), которые отсутствовали при артрите.

Таблица. Состав микробиоты крови и синовиальной жидкости при травме и артрите коленного сустава

№ п/п	Микробные маркеры, кл.х105/мл	Кровь	Травма	Артрит
Гр (+) кокки аэробные или факультативные				
1	Streptococcus (оральные)	249	504,25	665,17
2	Staphylococcus intermedius	756	0	239,67
3	Staphylococcus	120	0	18,00
4	Enterococcus	290	0	0
5	Streptococcus mutans (анаэробные)	229	53,50	61,83
Анаэробы				
6	Eubacterium	59	0	0
7	Eubacterium lentum (группа А)	169	13,75*	36,33
8	Eubacterium moniliforme sbsp	0	347,00	0
9	Eubacterium/Cl. Coccoides	2713	614,25*	953,17
10	Clostridium histolyticum	95	102,75	90,17
11	Clostridium propionicum	288	120,00	124,67*
12	Clostridium ramosum	2000	1678,25	3247,67
13	Clostridium perfringens	12	0	0
14	Clostridium difficile	385	117,00	100,17*
15	Bacteroides hypermegas	0	0	6,50
16	Propionibacterium	0	8,50	143,33
17	Propionibacterium/Cl. subterminale	1387	950,25	979,33
18	Propionibacterium spp. (P. freuden)	1378	0	0
19	Propionibacterium jensenii	185	0	143,33
20	Propionibacterium acnes	0	475,25	821,83
21	Peptostreptococcus anaerobius 1	0	10,75	33,67
22	Peptostreptococcus anaerobius 2	0	0	750,83
23	Prevotella	38	65,50	123,00
24	Bifidobacterium	3117	366,25	110,00*
25	Актиномицеты	77	11,75	12,00*
26	Actinomycetes 10Me14	309	115,75	233,17
27	Actinomyces viscosus	1190	114,00	173,83
28	Ruminococcus	785	706,00	868,00
29	Blautia coccoides	0	56,00	24,50
Гр (+) палочки аэробные или факультативные				
30	Bacillus cereus	23	0	56,17
31	Nocardia, 14:1d11	262	833,75	688,00
32	Nocardia asteroides	448	237,25	161,83
33	Lactobacillus	4339	1228,50	1536,33*
34	Actinomadura	110	362,75	0
35	Rhodococcus	423	124,50	97,00*
36	Corineform CDC-group XX	605	111,00	184,50
37	Bacillus megaterium	0	0	168,67
Гр (-) палочки аэробные или факультативные				
38	Stenotrophomonas maltophilia	0	0	13,17
39	Achromobacter	140	0	0
40	Alcaligenes	48	0	0
41	сем. Enterobacteriaceae (E.coli и пр.)	0	0	86,33
42	Campylobacter mucosalis	99	19,00	12,67*
43	Helicobacter pylori, h 18	14		
Артрит				
44	Микр грибы, кампестерол	842	103,75	0
45	Микр грибы, ситостерол	384	16,75	3,50*
46	Candida	549	4,25*	74,00
47	Streptomyces	62	33,50	135,17
48	Herpes	1648	105,25	108,33*
49	Цитомегаловирус	483	40,25	106,83
50	Pseudonocardia	70	7,75	3,00*
51	Сумма	25031	9888,75*	14216,67

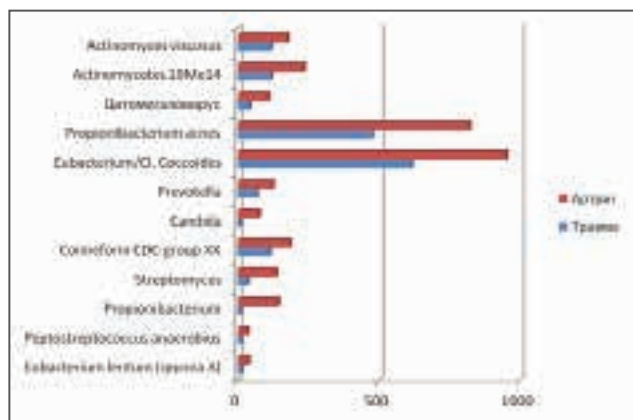


Рис. 1. Концентрация микробных маркеров в синовиальной жидкости (к.х.105/мл) при травме и артрите коленного сустава

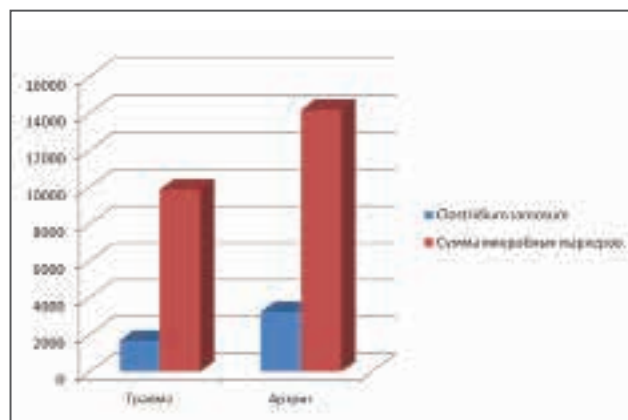


Рис. 2. Концентрация микробных маркеров в синовиальной жидкости (к.х.105/мл) при травме и артрите коленного сустава

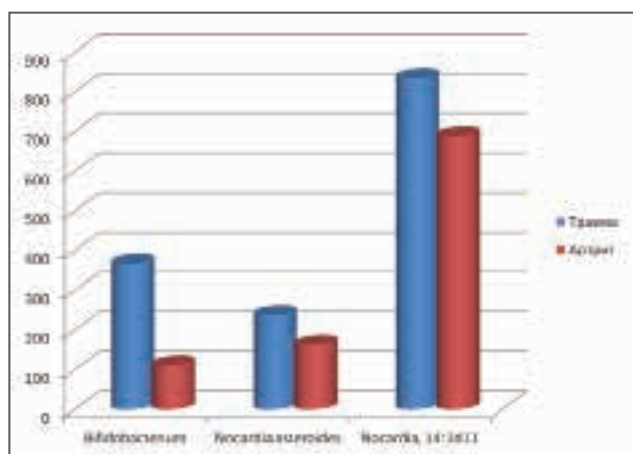


Рис. 3. Концентрация микробных маркеров в синовиальной жидкости (к.х.105/мл) при травме и артрите коленного сустава

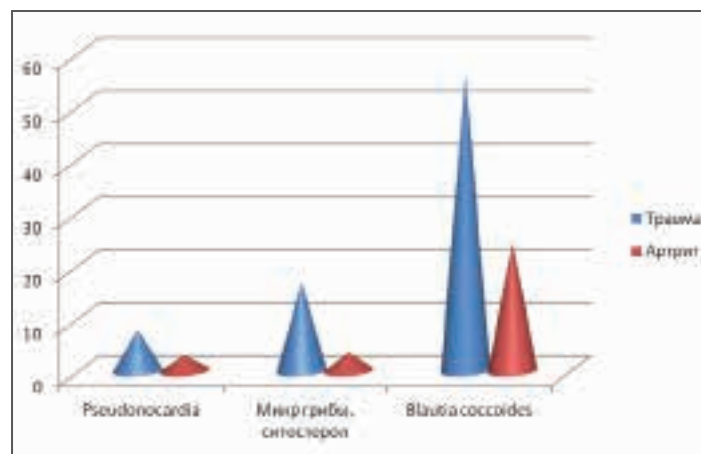


Рис. 4. Концентрация микробных маркеров в синовиальной жидкости (к.х.105/мл) при травме и артрите коленного сустава

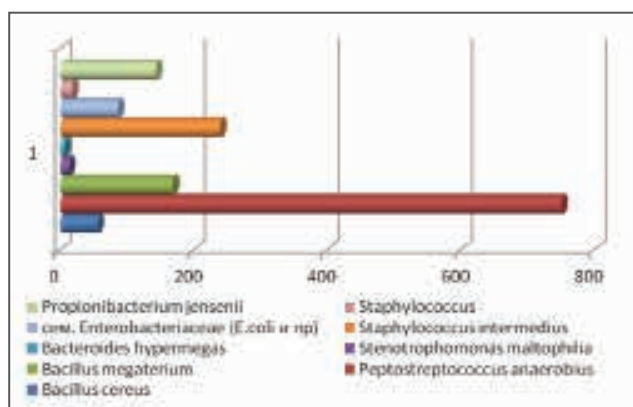


Рис. 5. Концентрация микробных маркеров в синовиальной жидкости (к.х.105/мл), выявляемых только при артрите коленного сустава

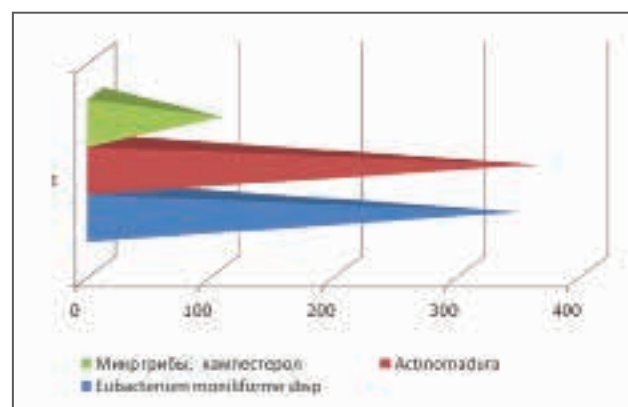


Рис. 6. Концентрация микробных маркеров в синовиальной жидкости (к.х.105/мл), выявляемых только при травме коленного сустава

Таким образом, при масс-спектрометрии микробных маркеров в СЖ у пациентов с артритом коленного сустава в отличие от группы с травмой коленного сустава выявлялись следующие характерные изменения микробиоты:

- увеличение микробных маркеров *Eubacterium lentum* (группа A), *Peptostreptococcus anaerobius*, *Streptomyces*, *Corineform CDC-group XX*, *Prevotella*,

Eubacterium/Cl. Coccoides, *Propionibacterium acnes*, Цитомегаловирус, *Actinomyces 10Me14*, *Actinomyces viscosus*, *Clostridium ramosum* в 1,5–4,7 раза, а *Propionibacterium* и *Candida* в 16,8–17,4 раза;

- появление в СЖ микробных маркеров *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus*, *Propionibacterium jensenii*, *Peptostreptococcus anaerobius* 2, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, сем. *Enterobacteriaceae* (*E.coli* и пр.);

– снижение концентрации микробных маркеров *Bifidobacterium*, *Nocardia*, *Nocardia asteroides*, *Pseudonocardia*, Микр грибы (ситостерол), *Blautia coccoides* в 1,5–4,7 раза;

– повышение общего количество микробных маркеров в 1,5 раза.

Заключение

Обсуждая пути инфицирования сустава при закрытой травме и артрите, в качестве эндогенного источника следует рассматривать, прежде всего, кишечный биоценоз. Полученные в результате исследования данные свидетельствуют о транслокации микроорганизмов в коленный сустав в результате его травмы или воспаления [11, 12]. Именно микроорганизмов, а не только их клеточных компонентов, по которым ведется исследование синовиальной жидкости методом масс-спектрометрии микробных маркеров при воспалении. Об этом свидетельствует либо превышение концентрации в ней липидных мономеров – жирных кислот, альдегидов, стерина – маркеров, специфичных для клеточных стенок микроорганизмов, по сравнению с кровью, либо диспропорция в сторону увеличения отдельных микробных маркеров. И то, и другое свидетельствует о наличии источника этих веществ в зоне воспаления, а значит и самих микробов. Это означает, что при синовите следует ожидать появления в зоне воспаления любых обитателей кишечника – к настоящему времени известно 1800 фенотипов на уровне рода по данным анализа 16S-rPHK. Метод, примененный в настоящем

исследовании, позволил сканировать одновременно 170 маркеров микроорганизмов разного таксономического уровня и их групп. Выявлено превышения уровня детектирования 47 из них, которые в разной комбинации и количественном выражении присутствуют у всех обследованных. Уровень смешанной инфекции и ее состав отражает специфику микробной этиологии синовита пациентов и дает дополнительную информацию для антибиотикотерапии и других лечебных действий по восстановлению микробиологического статуса больного.

Считается, что стимулом транслокации является избыточный рост кишечной микробиоты или стресс. В данном случае стрессом является травма сустава [12]. В настоящей работе в синовиальной жидкости обнаружены маркеры почти всех кишечных микробов, определяемых по маркерам в крови. Почему они приходят в сустав при воспалении приблизительно в том же составе, в котором они работают в кишечной биопленке? Вероятно для того, чтобы в очаге воспаления создать сбалансированную «лечебную биопленку» и тем самым препятствовать одностороннему развитию бактерий в состоянии экспрессии факторов патогенности. Тогда роль агентов воспаления можно придать тем микроорганизмам, которые проявляют диспропорциональный кишечнику рост в его очаге – суставе. Относительные изменения численности отдельных микроорганизмов в суставе – диспропорция в сравнении с их профилем в общем микробиологическом статусе (маркеры в крови) достигает десятков и сотен раз, что позволяет предполагать их в качестве потенциальных агентов воспаления.

Литература

1. Винчель Р.В. Роль нарушений в системе цитокинов в развитии гнойно-септических осложнений при эндопротезировании тазобедренных суставов и возможности их коррекции : Автореф. дис. ... канд.мед. наук. – Владивосток, 2009. – 32 с.
2. Фомичев Н.Г., Прохоренко В.М., Павлов В.В. и соавт. Идиопатический коксартроз: этиологическая связь с *Chlamydia trachomatis* // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2005. – № 4. – С. 1-4.
3. Жемаев М.В. Клиника, диагностика и лечение инфекционных осложнений после эндопротезирования тазобедренного сустава у больных пожилого и старческого возраста (клинич. исслед.): Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – СПб., 2004. – 23 с.
4. Ключевский В.В. Хирургические методы лечения инфекционных осложнений после эндопротезирования тазобедренного сустава : Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2008. – 27 с.
5. Ильин И.И. Негонококковые уретриты. – М.: Медицинская книга, 2005. – 288 с.
6. Jelk W., Aeschlimann A., Tyndall A. Reiter's disease-areview of an interdisciplinary disease// Schweiz-Rundsch-Med-Prax. – 1995. – Vol.84, № 37. – P. 989-999.
7. Fenton F.A., Ward H. National Chlamidia screening programme in England: making progress// Sex. Transm. Infect. – 2004. – Vol.80. – P. 331-333.
8. Молочков В.А., Шувалов Г.Н., Шевчук С.А. // Рос. журн. кож. и вен. бол. – 1998, № 5. – С. 42-44.
9. Ковалев Ю.И., Ильин И.И. Проблемы патогенеза, диагностики и терапии болезни Рейтера. – Челябинск, 1990. – С. 65-71.
10. Ильин И.И. Исторические и эпидемиологические аспекты болезни Рейтера: Сб. научн. тр./ Проблемы патогенеза, диагностики и терапии болезни Рейтера. – Челябинск. 1990. – С. 4-10.
11. 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.
12. Бокерия Л.А. Белобородова Н.В. Инфекция в кардиохирургии. – М.: НЦ ССХ им. А.Н. Бакулева РАМН, 2007 – 582 с.