

ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МИКРООРГАНИЗМОВ И ИХ СООБЩЕСТВ В КЛИНИЧЕСКИХ ПРОБАХ ПРИ ИНФЕКЦИЯХ И ДИСБИОЗАХ

Осипов Г.А.

В основе метода - высокоточное определение специфических маркерных молекул, входящих в состав клеточных липидов микроорганизмов. Высокочувствительный и селективный метод газовой хроматографии – масс спектрометрии (ГХ-МС) позволяет одновременно измерять концентрации более сотни микробных маркеров непосредственно в анализируемом материале: крови, моче, биоптатах и других биологических жидкостях и тканях, а также в небиологических пробах, минуя стадии предварительного посева на питательные среды или использование тестовых биохимических материалов. Разработан автоматический алгоритм анализа с помощью штатных программ ГХ-МС, позволяющих определить численность более 50 клинически значимых видов микроорганизмов в материале в течение трех часов с момента его поступления в лабораторию.

Оглавление

I. Введение

II. История метода

III. Основные типы клеточных жирных кислот и альдегидов микроорганизмов

IV. Хроматография и масс-спектрометрия маркеров микроорганизмов

V. Верификация метода

VI. Клинические приложения метода

VII. Заключение

I. Введение

Применяемые на сегодняшний день в клинической практике методы определения микробиологического статуса организма человека, а также диагностики инфекций 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, иммуно-серологический метод является непрямым, поскольку выявляет не возбудителя, а иммунный ответ на него, который может иметь индивидуальные вариации. Известные молекулярно-биологические методы, при несомненных преимуществах - прямое определение возбудителя, высокие специфичность и чувствительность, универсальность, скорость, возможность диагностики хронических и латентных инфекций – имеют такие серьезные недостатки, как частые ложноположительные результаты и невозможность адекватной количественной оценки^{1,2,3}.

Из всего вышесказанного вытекает очевидная востребованность в надежном количественном экспресс-методе диагностики дисбактериозов и определения возбудителей инфекции. Такими свойствами обладает метод масс-спектрометрии микробных маркеров (МСММ), основанный на количественном определении маркерных веществ микроорганизмов (жирных кислот, альдегидов, спиртов и стероидов) непосредственно в клиническом материале.^{4,5,6} В этом принципиальное отличие метода, придающее ему качественно новое свойство – возможность разложения суперпозиции всего пула микробных маркеров, что позволяет оценить вклад от каждого из сотен видов микроорганизмов, которые обитают, например, в кишечнике^{7,8}. Метод является высокочувствительным, быстрым (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. Диагностические возможности метода для выявления микробных маркеров в клинических материалах представляются перспективными. Внедрение ГХ-МС позволяет сократить время и стоимость исследования, минуя стадии повторных пересевов первичных колоний и тестовых ферментаций, которые особенно сложны, трудоемки и длительны для анаэробов. Метод позволяет не только определять маркерные вещества (жирные кислоты, альдегиды, спирты и стероиды) в чистых культурах микроорганизмов, выделенных из клинического материала по известной технологии^{9,10}, но и количественно определять состав микробного сообщества, который кроется за набором маркеров конкретной пробы.^{11,12,13} Материалом для исследования в клинике служат кровь, слюна, моча, ликвор, синовиальная или асцитическая жидкость, мокрота, мазки из зева, носовых и слуховых проходов, секреты половых органов, биоптаты и экссудаты тканей, смыв с кожи - в зависимости от конкретно решаемой задачи.

Технология отработана на хромато-масс-спектрометрах AT 597x D фирмы Agilent Technologies, США, и аналогичных приборах фирм Shimadzu (Япония), Micromass (Великобритания), Finnigan (США-Россия), состоящих из собственно масс-спектрометра, соединенного с ним хроматографа, системы вакуумной откачки и системы управления, сбора и

обработки данных. Для реализации метода принципиально необходимо, чтобы ГХ-МС система обеспечивала работу в режиме селективных ионов (синонимы масс-фрагментография, Single Ion Monitoring). Масс-спектрометр квадрупольный с диапазоном масс 2-1000 аем, должен иметь разрешающую способность 0,5 аем во всем рабочем диапазоне. Чувствительность прибора 50 пг по метил-стеарату в режиме непрерывного сканирования и 1 пг в режиме селективных ионов. Для анализа используют кварцевую капиллярную колонку с неподвижной фазой типа HP-5 ms.

Методу ГХ-МС микробных маркеров 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 3 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 и база данных.

II. История метода

Появление новых высокочувствительных аналитических систем в микробиологии сделало возможным изучение химического состава микроорганизмов, что привело к развитию хемотаксономии.¹⁴ Различие в химическом составе микробов послужило основанием для их классификации и появлению различных методик идентификации по какому-либо химическому веществу или группе веществ.^{14,15,16} В конце 60-х Abel одним из первых применил сведения о составе жирных кислот (ЖК) липидов цитоплазматической мембраны (ЦПМ) для дифференциации микроорганизмов. С тех пор был описан состав почти всех известных видов. Изучением их ЖК профилей занимались С.W. Moss¹⁷, E. Jantzen¹⁸, A. Sonesson¹⁹, а в СССР Л.В. Андреев²⁰, З.П. Васюренко¹⁵. Серии работ посвящены хемодифференциации клинически важных микроорганизмов.^{10,16,21} Метод маркера, т.е. выявление присутствия микроорганизма определенного рода или вида по присущему ему одному химическому веществу, используется

в различного рода анализах при изучении окружающей среды.^{22,23} Однако его возможности в области практической медицины мало изучены. Известна диагностика кандидомикоза по арабинитолу²⁴, попытки обнаружения микроорганизмов, содержащих в эндотоксине β -оксимиристиновую кислоту²⁵, диагностика менингококка²⁶, гонококка²⁷, видов *Naemophylus*²⁸ по специфическим оксикислотам. Они получили развитие в работах L. Larsson и его учеников.^{29,30,31}

Кроме ЖК, для хемодифференциации использовали ДНК, рибосомальную РНК, олигопептиды и белки ЦПМ, сахара, изопреноидные хиноны, фосфолипиды, нейтральные липиды, различные продукты метаболизма¹⁴. Для хемодифференциации используют в основном хроматографию: газовую, газожидкостную, с детекторами электронного захвата, масс-спектрометрическими, пламенно-ионизационными детекторами; иногда высокоэффективную жидкостную хроматографию, хроматографию в тонком слое, электрофоретические методы.^{32,33}

Из всех перечисленных методов наиболее практичным оказалась газовая хроматография и фирма Hewlett-Packard рискнула выпустить в 1987 г. специализированный хроматограф с методикой и математическим обеспечением для идентификации бактерий по составу жирных кислот и альдегидов (MIS - microbial identification system). Вскоре его производство было передано фирме MIDI Inc (Delaware, США). В настоящее время система носит название MIS MIDI "Sherlock" и широко используется за рубежом для быстрой и недорогой идентификации микроорганизмов в экологии, медицине и биотехнологии.

Газовая хроматография с масс-спектрометрией (ГХ-МС) показала себя как наиболее быстрый и чувствительный метод с высокой разрешающей способностью. Первоначально он применялся для изучения природных микробных сообществ. Этим занимался D.C.White и его группа³⁴ (Nichols 1987), и многочисленные его последователи, работающие методом PLFA (phospholipid fatty acids). Заслуга D.C.White состоит в обосновании специфичности жирных кислот фосфолипидов микроорганизмов в структуре и свойствах микробных сообществ. Этому обязано распространение метода в изучении микробиологии подземной биосферы, донных отложений водоемов и почв. Параллельно исследования велись в России, не только в области экологии^{13,35}, но и, в отличие от зарубежных авторов, в области специальной (медицинской) микробиологии. В результате был разработан метод анализа клинически важного микробного сообщества организма человека.^{12,16} Он отличается от зарубежных прототипов применением режима селективных ионов вместо полного сканирования масс-спектра и введением вместо одного маркера – сразу 150 маркеров, перекрывающих все изученное многообразие микроорганизмов в природе.

В этой главе книги описаны клинические применения метода масс-спектрометрии микробных маркеров. Этот мультиионный метод ГХ-МС анализа состава микробных сообществ *in-situ* был разработан на базе исследований НИИ биологического приборостроения

Минмедбиопроста⁶ при поддержке академика РАН Г.А.Заварзина и гранта Министерства экологии и охраны недр РФ «Экологическая безопасность России» (1993 г.). Методология анализа микробных сообществ методом ГХ-МС распространена при поддержке академиков РАН Ю.Ф. Исакова, А.А.Воробьева, В.Ф. Учайкина, проф. Б.А. Шендерова, проф. Н.В.Белобородовой, проф. А.С.Парфенова на диагностику воспалительных процессов и дисбиозов в медицине, проф. Н.В.Верховцевой – в почвах, агроценозах, илах, подземной биосфере и других экосистемах.^{35,36,37,38} Суммарно метод в приложении к экологическим и клиническим проблемам изложен в докторских диссертациях Г.А. Осипова¹⁶ (1996), И.Н. Ручкиной³⁹ (2005), И.В. Полеско⁴⁰ (2009), десяти кандидатских диссертациях, а также в статьях отечественной и зарубежной периодики, пособиях для врачей. Часть материала представлена в Интернете на сайте www.rusmedserv.com/microbdiag на русском и www.rusmedserv.com/microbdiag/eng на английском языках.

III. Основные типы клеточных жирных кислот и альдегидов микроорганизмов

Бактериям свойственно большое разнообразие ЖК и жирных альдегидов. В настоящее время их насчитывают более двухсот пятидесяти. В организме человека их всего около двадцати пяти. Это обстоятельство определяет возможность родового или видового анализа инфекций и дисбиозов на преобладающем фоне биологической жидкости непосредственно в клиническом материале.

ЖК в бактериях входят в состав различных классов липидов: фосфолипидов, гликолипидов, гликофосфолипидов, орнитин- и лизинсодержащих липидов, ацилглицеринов, эфиров жирных кислот, липопротеинов и липополисахаридов наружной мембраны грамотрицательных бактерий, некоторых других липидов⁴¹. Их содержание у большинства бактерий составляет 2 - 10 %. Длина цепи ЖК бактерий в основном составляет 10-20 атомов углерода. У многих таксономических групп преобладают ЖК с прямой цепью. Из насыщенных жирных кислот в наибольшем количестве содержится гексадекановая (пальмитиновая), из ненасыщенных - *цис*-9,10-гексадеценная (пальмитолеиновая) и *цис*-11, 12-октадеценная (*цис*-вакценовая). Последнюю считали ранее маркером патогенных бактерий (псевдомонады, энтеробактерии и другие), однако в организме человека в норме ее присутствие в основном определяется лактобациллами. Транс-вакценовая кислота характерна для *Nocardia asteroides*. Реже у бактерий встречается *цис*-9, 10-октадеценная (олеиновая) кислота, обычно содержащаяся в липидах эукариот^{14,15,16}. Для бактерий не характерны полиненасыщенные ЖК,

однако у некоторых из них (р.р. *Mycobacterium*, *Vibrio*, *Flexibacterium* и др.) они обнаружены.^{10,14}

Жирные кислоты с разветвленной цепью встречаются в изо-форме с локализацией метильной группы у предпоследнего атома углерода и антеизо-форме с локализацией метильной группы у 3-го от конца атома углерода. Преобладание в жирнокислотном спектре кислот с разветвленной цепью характерно для бактерий значительного числа таксономических групп: р.р. *Bacillus*, *Bacteroides*, *Staphylococcus*, *Legionella*, многочисленных видов актинобактерий – р.р. *Streptomyces*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium* и других^{42,43,44}. Коринебактериям и микобактериям, присуще наличие 10-метилоктадекановой (туберкулостеариновой) кислоты с локализацией метильной группы у 10-го атома углерода, а родококки имеют в клеточной стенке 10-метил-гексадекановую кислоту, которая является хорошим маркером клинически значимого вида *Rhodococcus equi*.^{14,42}

Гидроксикислоты содержат ОН-группу у 2-го или 3-го атома углерода (соответственно α - и β -гидроксикислоты). Главным образом, они являются компонентами липида А липополисахаридов грамотрицательных бактерий. Основной кислотой, связанной амидной связью в липиде А липополисахаридов *Salmonella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Bordetella*, является 3-гидрокситетрадекановая (β -гидроксимиристиновая, 14:0 3ОН) кислота. Одно время она считалась маркером *E.coli*, потом – сем. *Enterobacteriaceae*, пока не накопились данные по другим бактериям. Оказалось, что 14:0 3ОН- кислота содержится также в клетках фузобактерий, нейссерий, гемофильной палочки и других микроорганизмов. Виды *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Hydrogenophaga* имеют в ЛПС 2- и 3-гидрокси-додекановые (α - и β -гидроксилауриновые) и 3-гидроксидекановую кислоты в разных соотношениях, что позволяет различать их по родам в сообществах. В ЛПС бактерий группы *Bacteroides-Cytophaga-Flexibacter*, *Stenotrophomonas*, *Selenomonas*, *Chriseobacterium meningosepticum*, *Prevotella*, *Flavobacterium*, *Sphingobacterium* определены также нечетные разветвленные и прямоцепочечные α - и β - гидроксикислоты¹⁰. Помимо более распространенных β -гидроксикислот в состав липополисахаридов многих бактерий входят α -гидроксикислоты. Штаммы *Salmonella*, *Alcaligenes* и *Enterobacter cloacae* содержат 2-гидрокситетрадекановую (α -гидроксимиристиновую) кислоту, а *Bordetella bronchiseptica* и *Pseudomonas aeruginosa* – 2-гидроксидодекановую (α -гидроксилауриновую) кислоту.

В состав липидов многих бактерий входят уникальные жирные кислоты – циклопропановые, образующиеся из мононенасыщенных жирных кислот. Циклопропановые жирные кислоты имеют *цис*- конфигурацию. Для бактерий видов *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Brucella*, *Helicobacter* и других характерна *цис* –11,12-метиленоктадекановая

(лактобацилловая) кислота, происходящая из *цис*-вакценовой кислоты и *цис*-9,10-метиленгексадекановая кислота у представителей сем. *Enterobacteriaceae* (маркер семейства).

К настоящему времени состав жирных кислот большинства микроорганизмов изучен, показана его воспроизводимость, доказана их родо- и видоспецифичность⁹. Метод детектирования микроорганизмов по ЖК-маркерам 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. Т.е, профиль ЖК так же консервативен, как и строение ДНК. Исследования в области бактериальной палеонтологии подтвердили постоянство состава ЖК отдельных микроорганизмов и пула их жирных кислот, в целом, с глубины времен в 2.5 млрд. лет.³⁵ Наиболее часто встречающиеся в клинических пробах ЖК, альдегиды и стеринны перечислены в таблице 1 с отнесением к вероятным таксонам микроорганизмов.

Таблица 1

Высшие жирные кислоты альдегиды и стеринны в составе клеточной стенки с отнесением к микроорганизмам, у которых они наиболее часто встречаются (вещества приведены в порядке возрастания числа атомов углерода в цепи молекулы, что соответствует хроматографическому времени удерживания)

№	Обозначение*	Название	Микроорганизмы
Жирные кислоты			
1.	C10	Декановая	<i>Streptococcus</i>
3.	i11	Изоундекановая	<i>Stenotrophomonas</i> ,
4.	C12:0	Лауриновая	<i>Arcobacter</i> ,
6.	iC12	Изолауриновая	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
7.	iC13	Изотридекановая	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Bacillus subtilis</i> ,
8.	a13	Антеизотридекановая	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Brevibacterium</i>
9.	13:0	Тридекановая	<i>Selenomonas</i>
10.	i14	Изомиристиновая	<i>Streptomyces</i> , <i>Bacillus</i> , <i>актинобактерии</i>
11.	14:1Δ9	9,10-тетрадеценная	<i>Clostridium</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i>
12.	14:1Δ11	11,12-тетрадеценная	<i>Simonsiella</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Kingella kingae</i>
13.	14:0	Миристиновая	<i>Lactobacillus</i> , <i>Helicobacter</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Clostridium</i>
14.	2Me14	2-метил-тетрадекановая	<i>Mycobacterium gordonae</i>
15.	i15:1	Изопентадеценная	<i>Flavobacterium</i>
16.	15:1Δ9	9,10-пентадеценная	<i>Clostridium propionicum</i> , <i>Bacteroides hypermegas</i>
17.	i15	Изопентадекановая	<i>Propionibacterium</i> , <i>Bacteroides</i>
18.	a15	Антеизопентадекановая	<i>Staphylococcus</i> , <i>Bacillus</i> , коринеформные бактерии
19.	15:0	Пентадекановая.	Большинство видов микроорганизмов, минорный компонент, <i>Selenomonas</i> , <i>Clostridium sporogenes</i> ,

			<i>Bacteroides succinogenes, Bact. ruminicola, Pseudomonas stutzeri</i>
20.	i16:1	Изогексадеценная	<i>Desulfovibrio</i>
21.	16:1Δ7	7,8-гексадеценная	<i>Clostridium ramosum, Streptococcus</i>
22.	16:1Δ9	9,10-гексадеценная	Большинство видов микроорганизмов
23.	16:1Δ11	11,12-гексадеценная	<i>Ruminococcus</i>
24.	i16:0	Изопальмитиновая	<i>Streptomyces, Nocardiosis,</i>
25.	10Me16	10-метилгексадекановая	<i>Rhodococcus</i>
26.	16:0	Пальмитиновая	Большинство видов микроорганизмов
27.	i17:1	Изопентадеценная	<i>Campylobacter mucosales</i>
28.	17:1	Гептадеценная	<i>Mycobacterium, Candida albicans</i>
29.	i17:0	Изогептадекановая	<i>Bacillus, Propionibacterium, Prevotella</i>
30.	a17:0	Антеизогептадекановая	<i>Corynebacterium, Bacteroides, Nocardiosis, Nocardia</i>
31.	17сус	Циклогептадекановая	сем. <i>Enterobacteriaceae</i> (<i>E. coli</i> и др.)
32.	17:0	Гептадекановая	Большинство видов микроорганизмов, минорный компонент
33.	18:4	Октадекатетраенная	Некоторые грибы и дрожжи
34.	18:3	Линоленовая	Грибы и дрожжи
35.	18:2	Линолевая	Грибы, дрожжи, простейшие
36.	18:1Δ9	Олеиновая	Все организмы
37.	i18:1 Н		<i>Enterococcus faecalis</i>
38.	18:1Δ11	Цис-вакценовая	<i>Lactobacillus, Streptococcus, Pseudomonas, Cardiobacterium hominis</i>
39.	18:0	Стеариновая	Многие микроорганизмы
40.	i18	Изооктадекановая	<i>Peptostreptococcus, Bifidobacterium, Nocardiosis, Bacillus subtilis, Clostridium difficile</i>
41.	10Me18	10-метил-октадекановая, (туберкулостеариновая)	pp. <i>Mycobacterium, Nocardia</i> ; вв. <i>Corynebacterium bovis, C. гр. xerosis, C. urealyticum,</i>
42.	11Me18:1	11-метилоктадеценная	<i>Afipia, Helicobacter mustelae</i>
43.	19сус	Циклононадекановая	<i>Lactobacillus, Enterococcus, Pseudomonas, Brucella, Campylobacter, сем. Enterobacteriaceae, Helicobacter pylori</i>
44.	i19	Изононадекановая	<i>Bacillus subtilis, Bacteroides hypermegas</i>
45.	a19	Антеизононадека-новая	<i>Staphylococcus</i>
46.	19:0	Нонадекановая	<i>Nitrobacter, Bacillus, Serratia; Burkholderia cepacia</i>
47.	i19:1	Изо-нонадеценная	<i>Afipia</i>
48.	20:1	Эйкозеновая	<i>Propionibacterium jensenii, Streptococcus thermophilus, St. salivarius, St. mutans, Actinomyces</i>
49.	20:0	Эйкозановая	<i>Actinomyces</i>
50.	20:1Δ11	11-эйкозеновая	<i>Streptococcus mutans</i>
51.	21:0	Бегеновая	<i>Francisella</i>
52.	22:6	Докозагексенная	грибы, эукариоты
53.	22:0	Докозановая	<i>Francisella</i>
54.	C22:4	Арахидоновая кислота	Простейшие и высшие организмы
55.	24:0	Тетракозановая	<i>Francisella, Mycobacterium, микроэукариоты</i>
56.	25:0	Пентакозановая	Микроэукариоты
57.	26:0	Гексакозановая	<i>Mycobacterium, микроэукариоты</i>

Гидроксикислоты

58.	3h10	3-гидроксидекановая	<i>Bordetella pertussis</i> , <i>B. parapertussis</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> , <i>P. alcaligenes</i> , <i>P. stutzeri</i> , <i>P. mendocina</i> , <i>Comamonas</i>
59.	2h10	2-гидроксидекановая	<i>Pseudomonas</i>
60.	3hi11	3-гидроксиизоундекановая	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ,
61.	2hi11	2-гидроксиизоундекановая	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ,
62.	3h12:1	гидроксидодеценная	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
63.	3h12	3-гидроксилауриновая	<i>Acinetobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Vibrio</i> ; <i>Neisseria</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Arcobacter</i> , <i>Eikenella</i> , <i>Suttonella</i> , <i>Kingella</i>
64.	2h12	2-гидроксилауриновая	<i>P. putida</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Bordetella</i>
65.	3hi13	3-гидроксиизотридекановая	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ,
66.	3h13	3-гидрокситридекановая	<i>Selenomonas</i> ; <i>Bacteroides hypermegas</i> ,
67.	3h14	3-гидроксимиристиновая	<i>Alcaligenes</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Wolinella</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Burkholderia</i> , сем. <i>Enterobacteriaceae</i>
68.	2h14	2-гидроксимиристиновая	<i>Alcaligenes</i> , <i>Salmonella</i>
69.	2,3hi14	2,3-дигидроксиизотетрадекановая	<i>Legionella</i>
70.	3h15	3-гидрокси-пентадекановая	<i>Bacteroides ruminicola</i>
71.	3hi15	3-гидроксиизо-пентадекановая	<i>Flavobacterium</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Bacteroides melaninogenicus</i> ,
72.	2hi15	2-гидроксиизо-пентадекановая	<i>Flavobacterium</i>
73.	3ha15	3-гидроксиантеизо-пентадекановая	<i>Bacteroides ruminicola</i>
74.	3h16	3-гидрокси-пальмитиновая	<i>Erwinia</i> , <i>Brucella</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Wolinella</i> , <i>Cytophaga</i> , <i>Flexibacter</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Bordetella</i> ; <i>Burkholderia</i> , <i>P. pseudomallei</i> , <i>Campylobacter fetus</i> , <i>C. sputorum</i> , <i>C. fecalis</i>
75.	2h16	2-гидрокси-пальмитиновая	<i>Flexibacter</i> ; <i>Alcaligenes</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Ralstonia pickettii</i> (2h16:1), клетки эпителия, спермий и другие эукариотические клетки
76.	3hi16	3-гидроксиизо-пальмитиновая	<i>Riemerella</i>
77.	3hi17	Гидроксиизо-гептадекановая	<i>Bacteroides</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Cytophaga</i> , <i>Riemerella</i>
78.	2hi17	2-гидроксиизо-гептадекановая	<i>Bacteroides</i>
79.	3h17	3-гидрокси-гептадекановая	<i>Bacteroides ruminicola</i> , <i>B. thetaiotaomicron</i>
80.	3ha17	3-гидроксиантеизо-гептадекановая	<i>Bacteroides ruminicola</i>
81.	10h18:1	10-гидрокси-октадеценная	<i>Clostridium perfringens</i>
82.	3h18	3-гидроксистеариновая	<i>Francisella</i> (<i>F. philomiragia</i>), <i>Brucella</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Helicobacter pylori</i>
83.	2h18	2-гидроксистеариновая	Простейшие

84.	10h18	10-гидроксистеариновая	<i>Clostridium perfringens</i>
85.	9,10 эпоxy18	9,10-эпоксиоктадека- новая	<i>Pneumocistis carinii</i>
86.	3h20	3-гидроксиэйкозановая	<i>Chlamydia trachomatis</i>
87.	3hi20	3-гидроксиизо- эйкозановая	<i>Chlamydia trachomatis, Legionella</i>
88.	3h22	3-гидроксидокозановая	<i>Chlamydia trachomatis</i>
Спирты			
89.	16alc	n-пальмитиновый	<i>Moraxella</i>
90.	18alc, 2-ОН	Стеариновый, 2-ОН	<i>Mycobacterium MAIS,</i> n18 – <i>Moraxella</i>
91.	20alc	n-эйкозиловый	<i>Mycobacteria</i>
92.	2h20alc	2-оксиэйкозиловый	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
93.	2h22alc	2-оксидокозиловый	<i>Mycobacterium xenopii</i>
94.	2h24alc	2-окситетракозиловый	<i>Mycobacterium</i>
95.	2h26alc	2-оксигексакозиловый	<i>Mycobacterium</i>
Альдегиды:			
96.	12a	Лауриновый	<i>Butyrivibrio</i>
97.	13a	Тридекановый	<i>Butyrivibrio, Selenomonas</i>
98.	i14a	Изомиристиновый	<i>Bifidobacterium, Butirivibrio</i>
99.	14:1Δ9a	9,11-тетрадеценовый	<i>Butyrivibrio, Clostridium fimetarium</i>
100.	14:1Δ11a	11,12-тетрадеценовый	<i>Butyrivibrio, Clostridium fimetarium</i>
101.	14a	Тетрадекановый	<i>Butyrivibrio, Bifidobacterium, Spirochaeta,</i>
102.	i15a	Изопентадекановый	<i>Butyrivibrio, Lactobacillus (rumen), Propionibacterium</i>
103.	a15a	Антеизопентадекановый	<i>Butyrivibrio, Eubacterium, Frigoribacterium,</i> <i>Propionibacterium freudenreichii</i>
104.	15:1a	Пентадеценовый	<i>Butyrivibrio</i>
105.	15a	Пентадекановый	<i>Butyrivibrio</i>
106.	16:1Δ9a	9,10-гексадеценовая	<i>Butyrivibrio, Selenomonas, Lactobacillus,</i> <i>Eubacterium, Mobiluncus, Peptostreptococcus</i> <i>anaerobius</i>
107.	16:1Δ11a	11,12- гексадеценовый	<i>Clostridium fimetarium</i>
108.	16a	Пальмитиновый	<i>Clostridium fallax, Lachnospira, Butyrivibrio,</i> <i>Lactobacillus</i>
109.	i17a	Изогептадекановый	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
110.	a17a	Антеизогептадекановый	<i>Eubacterium, в. Propionibacterium freudenreichii</i>
111.	17суca	Циклогептадекановый	<i>Clostridium</i>
112.	17a	Гептадекановый	<i>Lactobacillus (rumen)</i>
113.	i18a	Изостеариновый	pp. <i>Eubacterium, Lachnospira, Butyrivibrio,</i> <i>Bifidobacterium, Selenomonas, Mobiluncus,</i> <i>Clostridium butircum</i>
114.	18:1a	Октадеценовый	<i>Eubacterium, Clostridium</i>
115.	18a	Стеариновый	<i>Clostridium thermocellum</i>
116.	a16a	Антеизопальмитиновый	<i>Clostridium acetobutlicum, Cl. butircum</i>
117.	19суca	Циклононадекановый	<i>Lactobacillus</i>
118.	19a	Нонадекановый	<i>Clostridium turobotircum</i>
Стерины			
119.		Копростанол - холестанол	<i>Eubacterium</i>
120.		Холестендиол	Простой герпес
121.		Холестадиенон	Цитомегаловирус

122.		Пневмоцистерол	<i>Pneumocystis carini, P. hominis</i>
123.		Кампестерол	Микроскопические грибы
124.		Эргостерол	<i>Aspergillus, Mucor</i> и др., содержащие эргостерол
125.		Ситостерол, β -ситостерол	Микроскопические грибы, растения
126.		Холестерин	Простейшие и высшие организмы

* - Обозначения веществ: 17:1 - 17- число атомов углерода, цифра после двоеточия - число двойных связей; h - оксикислота; a,i - в начале означает разветвление; сус - циклопропановая кислота. Например, ha17 - 3-оксиантеизогептадекановая кислота.

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

Для отнесения маркеров к конкретным микроорганизмам наряду с авторскими данными (740 штаммов микроорганизмов) использована база данных (2000 штаммов) прибора Шерлок (MIDI Inc, Delaware, USA) для хроматографической идентификации микроорганизмов по жирным кислотам. Привлечены также сведения из литературных источников для получения представлений о реальном составе сообщества микроорганизмов в тканях и биологических жидкостях человека в норме и при патологических изменениях, а также о составе высших жирных кислот и альдегидов их клеточных стенок.^{10,18,42,45} Кроме того, на веб-сайтах некоторых микробных коллекций в свободном доступе наряду с последовательностями гена 16S рРНК имеются также и жирнокислотные профили многих изолятов.

На основании известных данных о наиболее распространенных в организме человека микроорганизмах⁴⁶ составлена локальная база данных состава жирных кислот, которая использована для выявления маркеров и составления расчетных формул. Ниже приводится обоснование принадлежности маркеров конкретным микроорганизмам, предполагаемым обитателям стенки кишечника, а также выбор конкретного маркера или схемы расчета для вычисления их концентрации.

Bifidobacterium. Численность бифидобактерий измеряли по компоненту специфического липида клеточной мембраны - плазмалогена, в котором одна из жирных кислот глицерида заменена жирным альдегидом. Для бифидобактерий отличительным является октадеценовый альдегид⁴⁷, который и регистрировали в качестве меры их концентрации.

Lactobacillus. Лактобациллы имеют четкие маркеры - лактобацилловую кислоту⁴⁷ и цис-вакценовую (18:1 Δ 11), которые встречается и у других бактерий, например, псевдомонад и энтеробактерий. Однако, псевдомонады редко обнаруживаются в кишечнике в заметных концентрациях, а перекрестное определение с энтеробактериями учитываются в уравнении баланса концентраций ЖК с использованием дополнительных маркеров. Здесь для контроля лактобацилл принята цис-вакценовая кислота.

Семейство Enterobacteriaceae. Энтеробактерии близки по профилю ЖК, при этом допускают родовую (иногда – видовую) дифференциацию в чистой культуре клеток, но вряд ли различимы в целом при одновременном присутствии в сообществе микроорганизмов. Их маркеры β -оксимиристиновая кислота (h14), циклогептадекановая (17сус) и цис-вакценовая кислоты^{10,47,15} имеют ранг семейства, при многочисленных перекрестах с представителями других семейств. Здесь, при отсутствии псевдомонад реально оценивать количество энтеробактерий в целом по концентрации 17сус.

Klebsiella. Клебсиеллы среди других членов семейства *Enterobacteriaceae* имеют отличительный признак - 2-оксимиристиновую кислоту (собственные измерения) в составе ЛПС, которая в данном сообществе оказывается маркером рода.

Eubacterium. Представители этого рода являются одними из основных обитателей кишечника. Их маркер, дегидрохолестерол (копростанол) является продуктом интерактивного метаболизма *Eubacterium* и клеток организма-хозяина⁴⁸. Для дифференциации эубактерий на уровне вида и подвида использованы их различия в составе жирных альдегидов (табл. 2). Кроме того, виды *Eubacterium* определяли по специфическим жирным альдегидам⁴⁷, в том числе *E.lentum* по изо-гексадекановому альдегиду (i16a), группу штаммов этого вида, включая 7741 и другие, у которых лидирует в профиле тетрадекановый альдегид⁴⁹ (14a).

Propionibacterium. Для детектирования пропионобактерий использованы изо- и антеизо-гептадекановые альдегиды (i17a и a17a) согласно базе данных MIDI Inc и нашим собственным измерениям состава ЖК штамма типового вида *Propionibacterium freudenreichii* из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ).

Peptostreptococcus anaerobius. Известно, что этот микроорганизм имеет в профиле ЖК редко встречающиеся четные изоокислоты с числом атомов углерода от десяти до шестнадцати.⁵⁰ Нами использованы в качестве маркера изо-додекановая (i12) и изо-тетрадекановая (i14) кислоты.

Ruminococcus. Определяли по 11-гексадеценевой кислоте, обнаруженной нами в природных изолятах руминококков.⁵¹

Propionibacterium acnes. Для определения этого организма использован (собственные данные) изо-пентадекановый альдегид (i15a), после вычета вклада эубактерий.

Bacillus. Присутствие бацилл видов *B.cereus* и *B.subtilis* можно детектировать по специфическим разветвленным кислотам с 13 атомами углерода: i13 и a13.⁴³ *B.megaterium* определяли по остатку антеизо-пентадекановой (ai15) кислоты в уравнении баланса.

Acinetobacter. В качестве родового признака удобно использовать 2-оксидодекановую кислоту при наличии 3-оксидодекановой.¹⁰

Clostridium ramosum и ее группа (*C. innocuum*, *C. clostridioforme*), а также неопределенно большая группа других видов клостридий⁴⁷, отличаются высоким содержанием в мембране 7-гексадеценевой (16:1Δ7) кислоты.

Clostridium perfringens. Имеет четкие маркеры, характерные для группы клостридий, включающей, кроме *C. perfringens*, также *C. histolyticum* и *C.oedematiens*. Это 10-оксистеариновая и 10-оксиоктадеценевая кислоты, легко определяемые по специфическим ионам в масс-спектре¹⁶. Эти вещества не являются клеточными компонентами самих клостридий, а связаны с разложением клеток ткани макроорганизма бактериальными ферментами.⁵²

***C.difficile* и другие клостридии**. *C.difficile* отличаются от других клостридий наличием в составе ЖК изо-октадекановой (i18) кислоты, *C.hystolyticum* – изо-тетрадеценевой.⁵³

Bacteroides. Анаэробные бактерии группы *B.fragilis* имеют хороший маркер - пару разветвленных оксикислот: гидроксидо-изо-гептадекановую (hi17) и антеизо-гептадекановую (ha17).^{54,55,56} Численность остальных бактериоидов оценивали по остатку в балансе гидроксидо-гексадекановых кислот.

Streptococcus. Многие стрептококки “невидимы” на фоне компонентов биологической жидкости из-за совпадения собственных жирных кислот с кислотами субстрата. Однако группа оральных стрептококков (α-стрептококки), *S. salivarius* и др., имеющих в составе декановую кислоту C10⁵⁷, а также мононенасыщенные кислоты 16:1Δ7 и 18:1Δ11⁴⁷.

S. mutans – анаэробный стрептококк, его отличительным признаком является 11-эйкозеновая кислота 20:1ω9.⁴⁷ Могут быть перекрестные определения с некоторыми клостридиями.

Enterococcus. Энтерококки группы *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* также могут быть обнаружены при их лидерстве в сообществе по лактобацилловой (19сус) кислоте⁴⁷, если сами лактобациллы определены по 18:1Δ11.

Candida albicans, Mycobacterium. Специфическим признаком микроскопических грибов *C. albicans* в липидной фракции биологических жидкостей человека является гептадеценовая кислота [собственные данные]. Нельзя исключить, что он может относиться так же к нетуберкулезным микобактериям, обитающим во рту и кишечнике, например *Mycobacterium terrae*, известные участием в инфекционных процессах.⁵⁸

Микроскопические грибы. Неспецифическим маркером клинически значимых микроскопических грибов (*Aspergillus, Candida, Mucor* и др.) является эргостерол⁵⁹, а также кампестерол и ситостерол⁶⁰ (собственные измерения).

Flavobacterium (Sphingobacterium, Chriseobacterium). Эти бактерии имеют разветвленные нечетные 2-оксикислоты в составе клеточных сфинголипидов (2hi15, 2hi17), которые могут служить маркерами в клинических пробах.¹⁰

Streptomyces, Nocardiosis. В профилях ЖК биологических жидкостей пациентов присутствует значительное количество изогексадекановой кислоты i16, существенно превышающее возможную долю *P. anaerobius* и *Bacillus*, имеющих это вещество в составе клеточной мембраны. Редкими организмами (из известных нам), обладающих этим признаком являются представители рода *Streptomyces* и некоторых других актиномицетов (например, *Nocardiosis dasonviley*, выделенный нами из биоптата слизистой оболочки кишечника). Штаммы стрептомицетов, имеющие до 40% i16 в профиле жирных кислот описаны в литературе⁶¹. Имеются также данные об участии стрептомицетов в колонизации и воспалениях различных органов человека.⁴²

Actinomadura. Определяли по 10-метил-гептадекановой кислоте (10Me17) за вычетом вклада родококков⁴²

Pseudonocardia. К этому роду аэробных актиномицетов отнесена изо-гексадеценовая кислота (i16:1), так же за вычетом родококков.⁴²

Rhodococcus. Наиболее вероятно родококами обусловлено наличие в составе жирных кислот всех исследованных нами проб 10-метил-гексадекановой кислоты (10Me16).⁴²

Nocardia. Определяли по изомеру тетрадеценовой (предположительно, 14:1d11) кислоты, обнаруженному нами в изоляте нокардий из клинической пробы. *Nocardia asteroides* и другие виды определяли по транс-9,10-гексадеценовой кислоте (16:1ω7t).⁴²

Helicobacter pylori. Практически везде в клинических пробах присутствует гидроксидекадекановая кислота (h18). Эта оксикислота характерна для рода *Francisella* и вида *Helicobacter pylori*.⁶² В нашем случае логично отнести наличие h18 к *Helicobacter pylori* или к *F. filomiragia*. *H. pylori* традиционно связывают с хроническим гастритом, однако его обнаруживают в тканях больных с изъязвлениями языка⁶³, атеросклеротических бляшках⁶⁴ и абсцессе печени. Кроме того, ГХ-МС анализ штаммов, выделенных из биоптатов кишечника в данной работе, показал наряду с традиционно известными для *H. pylori* ЖК (18:1d11, 16:0, 19сус, 3h16, 3h18) наличие 11Me18:1, 2h18:1 и 11-ОМе-19. По данным определителя неферментирующих грамотрицательных бактерий¹⁰ в профиле ЖК *H. pylori* присутствует 11Me18:1 (под обозначением 19:1br) и неидентифицированный компонент с относительным временем удерживания 19,735, совпадающий с определенным нами RRT=19,733 для 11-оксиметил-нонадекановой кислоты.

Campylobacter mucosalis. Этот вид имеет в составе жирных кислот редкую изо-гептадеценовую (i17:1) кислоту⁴⁷, по которой проводили его мониторинг, при учете вклада бактерий родов *Chriseobacterium* и *Flavobacterium*, если присутствовал их маркер 2hi15.

Fusobacterium spp., Haemophilus influenzae. Единственным отличительным компонентом в клеточных ЖК эти бактерий является 3-оксимиристиновая кислота (3h14)⁶⁵, которая к тому же встречается и у других грамотрицательных организмов клинического значения, таких как *E. coli*, *Klebsiella*, *Serratia* и другие. Поэтому *Fusobacterium*, *Haemophilus* могут быть определены лишь по остатку в уравнении баланса для 3h14.

Staphylococcus. Известно, что стафилококки содержат нечетные изо- и антеизо-разветвленные кислоты с числом атомов углерода 15, 17 и 19.⁶⁶ В качестве родового маркера в данном сообществе можно использовать антеизо-нонадекановую (ai19) кислоту.

Corinebacterium CDC groups. Listeria spp После учета всех микроорганизмов, имеющих в составе ЖК антеизо-гептадекановую кислоту, часто наблюдается остаток. Представляется наиболее вероятным отнести его за счет неучтенных коринебактерий, известных особенно высоким содержанием кислот a15 и a17, и по этому признаку выделенных в отдельную группу CDC A-3, A-4, A-5, B-1a, B-3a, B-1b, B3b, а также *C. betae*, *Corinebacterium aquaticum*, листерий и бревибактерий.⁶⁷

Вирусы. При сопоставлении наших данных с данными анализа иммунным и генетическим методами ряда пациентов с различными патологиями мы обнаружили корреляцию в появлении метаболита холестерина холестеридиола при инфекции вирусом герпеса и холестадиенона при инфицировании цитомегаловирусом.

Pseudomonas aeruginosa. Псевдомонады имеют четкие маркеры из состава C10 и C12 оксикислот¹⁰, которые допускают их ограниченную видовую дифференциацию даже на фоне биологической жидкости. В качестве родового признака удобно использовать 3-оксидекановую кислоту (3h10). Альтернативных микроорганизмов с таким признаком в биологических жидкостях человека нет. Для *P. aeruginosa* возможна видовая идентификация по специфичной для вида 2-оксидодекановой кислоте (2h12). В наших клинических штаммах *P. aeruginosa* обнаруживается еще один маркер – 3-оксидодекановая кислота (3-оксилауриновая кислота, 3h12). Кроме того у некоторых из них отсутствует 3-оксилауриновая кислота (3h12) по сравнению с известным из литературы соотношением 3h/2h изомеров равном 2/3.

Mycobacterium spp. Неспецифическим тестом на микобактерии в методе ГХ или ГХ-МС является наличие туберкулостеариновой кислоты (10-метил-октадекановой - 10Me18) в очаге поражения⁴⁶. Дополнительные данные, полученные за последнее время по 3-оксикислотам липидов микобактерий, позволяют предложить дополнительные маркеры для *M. tuberculosis* и других представителей рода. Маркером *M. tuberculosis* при этом оказалась 3-ОН-2,4,6-триметил-тетракозановая кислота²³. Накопленный к настоящему времени материал по составу липидов микобактерий дает принципиальную возможность разработки метода их быстрого определения непосредственно в биологических жидкостях, используя селективность и чувствительность метода ГХ-МС.

Brucella, Francisella, Bacteroides ureolyticus. Эти микроорганизмы могут быть ассоциированными с 3-гидроксигексадекановой кислотой (3h16) в биологических жидкостях человека¹⁰. При конкретном отнесении маркера учитывают сопутствующие клинические факторы. При менингитах следует отнести его к *Francisella filomiragia*, а при инфекциях УГТ к *Bacteroides ureolyticus*. Другие бактериоиды, виды *Burkholderia* и *H. pylori* также имеют эту кислоту, но их доля может быть учтена в расчетной формуле на основании величин их собственных маркеров и их соотношения с 3h16.

Chlamydia trachomatis. Этот внутриклеточный паразит имеет сразу три маркерных оксикислоты: 3-оксиэйкозановую (3h20), 3-окси-изоэйкозановую (3hi20) и 3-оксидокозановую кислоту (3h22), которые удобны для масс-спектрометрического детектирования.⁶⁸

Prevotella melaninogenica определяется по относящемуся только к ней маркеру – 3-гидрокси-изопентадекановой кислоте (3hi15)⁵⁵.

Butyrivibrio/Clostridium fimetarium, бактерии пищеварительной системы жвачных животных, определяются по изопентадекановому альдегиду (i15a). На коже вклад в этот маркер дает также *Propionibacterium acnes*.⁴⁷

Некоторые вещества характерны для всех или большинства микроорганизмов: это пальмитиновая(16:0), стеариновая (18:0), миристиновая (14:0), олеиновая, лауриновая (12:0) кислоты и некоторые др. Кислоты с 18 и 16 атомами углерода присутствуют во всех клетках и не могут быть маркерами.

IV. Хроматография и масс-спектрометрия маркеров микроорганизмов

Суть анализа состоит в прямом извлечении с помощью экстракции высших жирных кислот, альдегидов и стероидов из подлежащего исследованию образца, их разделения на хроматографе в капиллярной колонке высокого разрешения и анализа состава 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 трех часов. Его результатом является количественное определение состава микроорганизмов.

Образцы биологической жидкости или ткани обрабатывают сразу или замораживают и хранят при $-5/ -18^{\circ}\text{C}$ в случае, когда немедленный анализ невозможен. Допускается транспортировка проб при нормальной температуре в течение пяти часов. Допускается длительное хранение в высушенном виде при необходимости дальнейшей транспортировки или пересылки пробы по почте (высушивать при температуре $70-85^{\circ}\text{C}$).

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°C . 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°C 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°C 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°C 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 отстояться в течение 5 мин при комнатной температуре. Экстракт переносят в чистую виалу, высушивают 7 мин при 80°C, и сухой остаток обрабатывают 20 мкл N,O-бис(триметилсилил)-трифторацетамида в течение 15 мин при 80°C 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°C с добавлением такого же объема метанола. Если осадок не образуется, на анализ берут 1 мл мочи и упаривают до вязко-жидкого или сухого состояния. Затем в сосуд, где проводили упаривание, вносят микропипеткой 0,6 мл 1 М HCl в метаноле и той же микропипеткой соскабливают осадок со дна сосуда. Переведя его во взвесь, переносят в виал и подвергают кислую метанолизу, согласно протоколу для крови.

Мокроту, гнойный экссудат, вагинальный секрет, эякулят и другие густые субстанции готовят к анализу так же, как кровь - подсушивают 100 мкл пробы (всю пробу) и подвергают кислую метанолизу.

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°C в течение часа. Дальнейшие операции проводятся в той же последовательности, что и при приготовлении проб крови.

Для проведения анализа смесь эфиров в количестве 2 мкл вводят в инжектор ГХ-МС системы вручную или посредством автоматической системы ввода проб (автосемплера), 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 °С. 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 C12-C15, C17, C19. 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. Полное сканирование используют эпизодически для идентификации компонентов в новых пробах или для разметки программы временных интервалов МФ. В таблице 3 показано распределение ионов по временным интервалам в программе ГХ-МС для анализа микробных маркеров в пробах биологических жидкостей и тканей человека с указанием детектируемых маркеров и соответствующих им микроорганизмов.

Таблица 2

Группы сканируемых ионов, маркеров и соответствующих микроорганизмов

Группа	Начало (мин)	Ионы	Вещества	Микроорганизмы
1	3,0 перед C10	87,1 175,2 259,2 287,3 243,3 241,2 270,3 301,2 75,1 90,1 103,1 186,2	Общий ЖК от C10- до C16: Δ 11 3h (общий) h10 (M-15) h12 (M-15) 2h12 i,a15a i16 hi13, h13 Жирные альдегиды C13CD ₃ Жирные спирты 10:0	<i>Clostridium, Bacillus, Peptostreptococcus</i> <i>spp.</i> , <i>Ruminococcus, Nocardia asteroides</i> <i>Neisseria spp., Acinetobacter</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Pseudomonas, Neisseria, Moraxella spp</i> <i>P.aeruginosa, Acinetobacter</i> <i>Butyrivibrio spp</i> <i>Streptomyces spp.</i> <i>Stenotrophomonas, Selenomonas</i> <i>Propionibacterium, Eubacterium spp,</i> Дейтеротридекановая кислота, внутренний стандарт Компоненты кожного сала <i>Streptococcus (оральные)</i>
2	12,3 после C16:1	271,2 175,2 315,3 103,1 75,1 253,2	2h14 3h, общий h14 M Жирные альдегиды i16a	<i>Alcaligenes</i> <i>Fusobacterium, сем. Enterobacteriaceae</i> <i>Fusobacterium, Haemophilus</i> <i>Enterobacteriaceae</i> Компоненты кожного сала <i>Eubacterium lentum</i> <i>Eubacterium lentum</i>
3	12,8	87,1 285,2	i,a,n17:0; 10Me16; 18:1 Δ 11 2h (общий), 2hi15	Коринеформы <i>CDC, Propionibacterium,</i> <i>Rhodococcus sp, Lactobacillus</i> <i>Flavobacterium spp.</i>

	После 3h14	250,2 298,3 175,2 75,1	17сус, i17:1 и 17:1 i18 3h общий Жирные альдегиды	<i>Enterobacteriaceae, Candida, Campylobacter spp. Clostridium difficile Prevotella spp. Eubacterium spp., P. freudenreichii</i>
4	15,0 после 18:1Δ1 1	273,3 87,1 75,1 281,3 399,3 427,3 175,1 312,3 278,2 199,2 383,3 117	10h18, 10h16 ЖК (общий) Жирные альдегиды Δ9, Δ11-18:1a hi20, h20 h22 3h16, 3h18 i,a,n19:0 19сус, 19:1; 11Me18:1 10Me18 2h22 2h20alk	<i>C. perfringens, Malassesia Staphylococcus, Actinomyces, Streptococcus mutans Bifidobacterium, Enterococcus spp. Eubacterium, Bifidobacterium Chlamidia trachomatis Chlamidia trachomatis Prevotella, Bacteroides spp., Helicobacter pylori, Burkholderia Staphylococcus, Mycobacteria spp. Enterococcus sp Afipia, Helicobacter mustelae Mycobacteria, Corinebacterium spp. Микроскопические грибы Mycobacterium tuberculosis</i>
5	23,0 после h22	411,3 370,3 456,3 382,3 363,3 343,3 472,3 396,3	2h24 Копростанол Холестендиол Холестадиенон Эргостерол Кампестерол Метилхолестанол β-ситостерол	Микроскопические грибы <i>Eubacterium spp.</i> Вирус герпеса Цитомегаловирус Микроскопические грибы Микроскопические грибы Вирус герпеса Микроскопические грибы

Интервалы сканирования устанавливаются по группам ионов следующим образом: 1 группа, - начало - за 0,5 минуты до выхода декановой кислоты, окончание - промежуток между C16:1 и C16:0; 2 группа - ее началом является время окончания 1-й группы, окончание - перед туберкулопальмитиновой кислотой - 10Me16 (пик по иону 87 перед изогептадекановой кислотой - i17:0); 3 группа - окончание второй и время между 18:1Δ11 и 18:0, ближе к 18:0, чтобы обязательно измерить пик цис-вакценовой кислоты (18:1Δ11); 4 группа - окончание 3-й и 1 мин после выхода C24:0; 5 группа - окончание 4-й и до выхода метаболитов холестерина, примерно пять минут после его пика, чтобы зафиксировать β-ситостерол (m=396) и метилхолестанол (m=472). Временные интервалы корректируются под параметры хроматографической колонки и ГХ-МС прибора пользователя.

Сбор данных состоит в измерении площадей пиков ионов определенной массы на селективной хроматограмме специфических веществ - маркеров микроорганизмов (рис. 1).

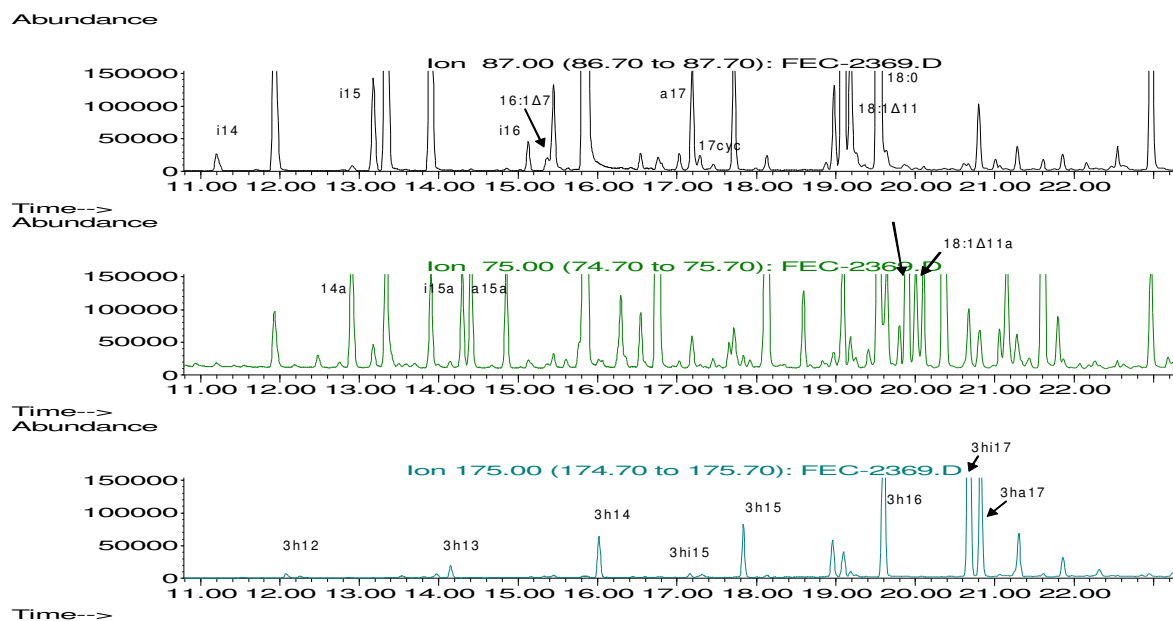


Рис. 1. Селективные хроматограммы жирных кислот (ион 87, верхний рисунок), жирных альдегидов (ион 75, рисунок в середине) и гидроксикислот (ион 175, нижний рисунок), экстрагированных из клинического материала, содержащего микроорганизмы и/или их маркеры. Обозначения веществ: 17:1 - 17- число атомов углерода, цифра после двоеточия - число двойных связей; h - оксикислота; a,i - в начале означает разветвление; alc - в конце символов - спирт, cyc - циклопропановая кислота. Например, ha17 - 3-оксиантеизогептадекановая кислота, 2h24alc - 2-окситетракозиловый спирт.

Для этого набирают или вводят готовую программу формата **Method** в соответствии с принятыми в программном обеспечении ГХ-МС-системы способом и формой. Полученные хроматограммы обрабатывают автоматически, пользуясь соответствующей опцией штатной программы обработки данных. В приборах Agilent Technologies - это опция "Calculate" в меню "Quantitate" программы Enhanced Data Analysis. Частично, данные автоматической обработки требуют ручной проверки измерения пиков. Это относится к неположительно разделенным на хроматограмме пикам или малым пикам, находящимся в соседстве с более интенсивными. Их находят, руководствуясь закономерностями появления на хроматограмме, т.е. абсолютными и относительными временами удерживания, подтверждением дополнительными ионами и соотношением площадей ионов. Для облегчения поиска нужного иона используют шаблоны и масс-спектры в файле, полученном в режиме полного сканирования. В процессе приобретения навыков полезно пользоваться библиотекой масс-спектров и хроматографировать в том же режиме стандартные смеси ЖК, имеющиеся в продаже. Масс-спектры ЖК имеют характерные признаки в гомологических рядах, по которым после некоторого навыка оператор сможет определять вид кислоты, не тратя время на библиотечный поиск. При масс-спектрометрическом детектировании отпадает необходимость и в повторном использовании стандартными смесями, так как для идентификации вещества в сомнительных случаях

достаточно пяти параметров, заложенных в программе. Это абсолютное время удерживания, расположение пика относительно известного репера, характерные основной и дополнительный (контрольный) ионы и соотношение их площадей или интенсивностей. Типичные масс-спектры ЖК приведены на рисунках.

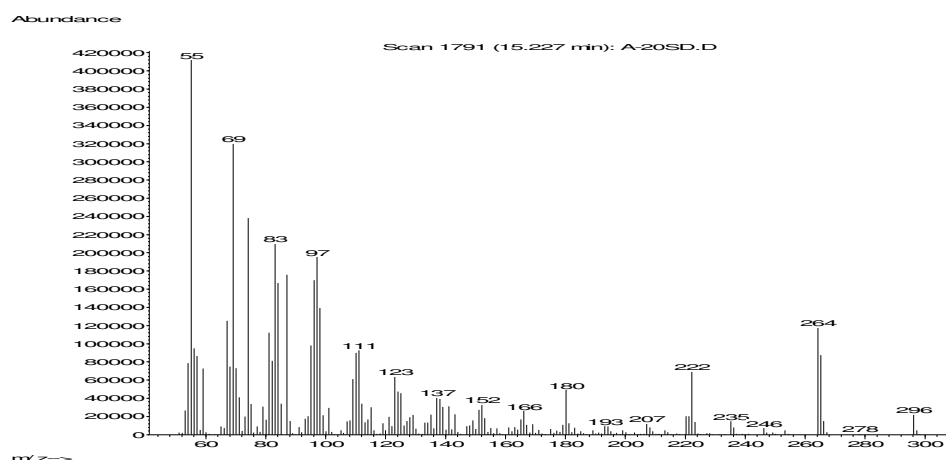


Рис2. Масс-спектр октадеценовой кислоты в виде метилового эфира. Молекулярный ион M=296

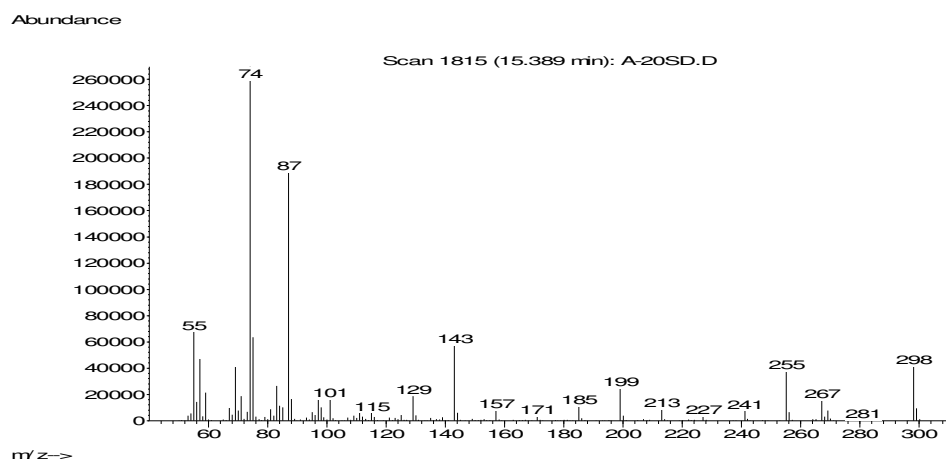


Рис 3. Масс-спектр октадекановой кислоты в виде метилового эфира. В гомологическом ряду нормальные ЖК отличаются между собой лишь молекулярным ионом (здесь M=298) и ионами M-31 и M-43, соответственно 267 и 255.

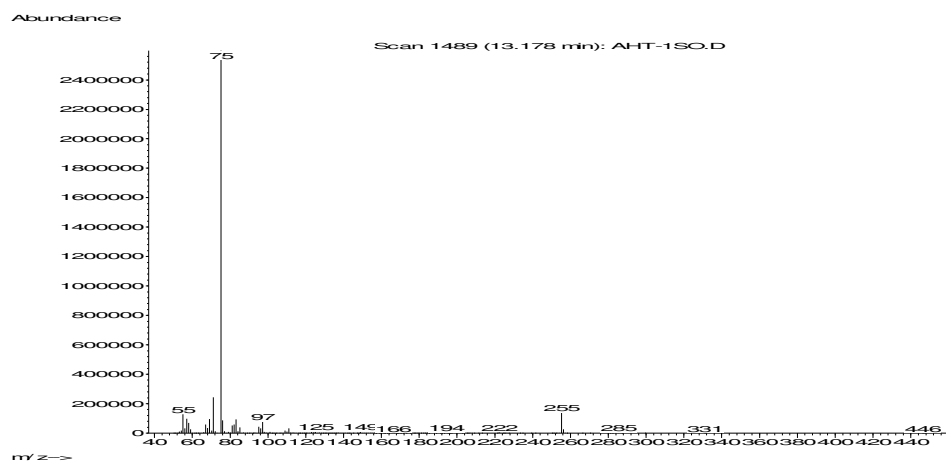


Рис 4 . Мас-спектр гексадеканового альдегида в виде диметилацетали (ДМА) - 16а. В гомологическом ряду ДМА отличаются характерным ионом М-59. Здесь ион с массой 255.

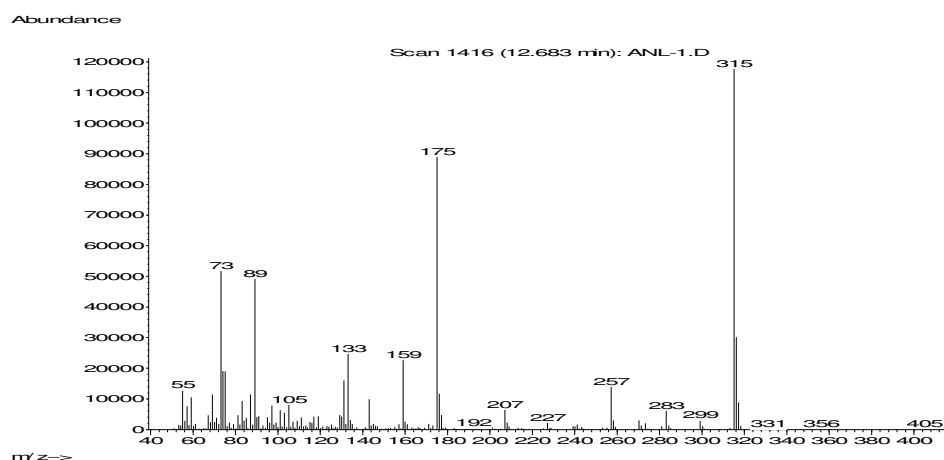


Рис 5. Мас-спектр β -гидроксимиристиновой кислоты (14:0 3ОН) в виде Me-TMS производного. Общий характерный ион ряда 3-гидрокси ЖК $m=175$, характерный ион, свидетель молекулярного (M-15), здесь $m=315$.

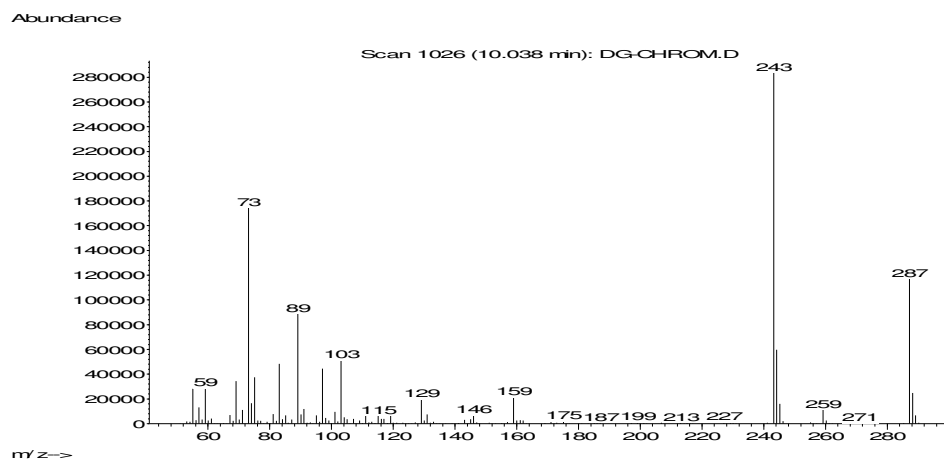


Рис 6. Мас-спектр α -гидроксилауриновой кислоты (12:0 2ОН) в виде Me-TMS производного. Общий характерный ион ряда 2-гидрокси ЖК $m=159$, характерные ионы, свидетель молекулярного (M-15), здесь $m=287$ и 243 (M-59).

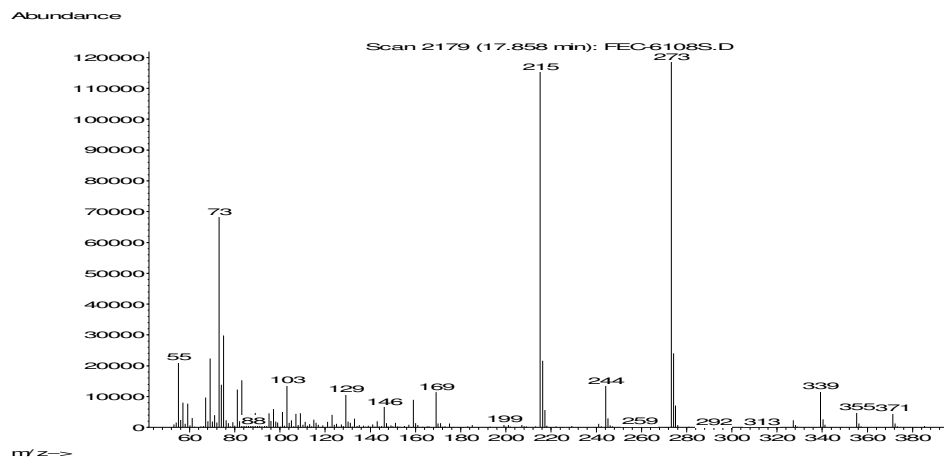


Рис 7. Масс-спектр 10-гидроксистеариновой кислоты (18:0 10ОН) в виде Me-TMC производного. Характерные ионы $m=273$ и 215 , а также свидетель молекулярного иона $m=371$ (M-15).

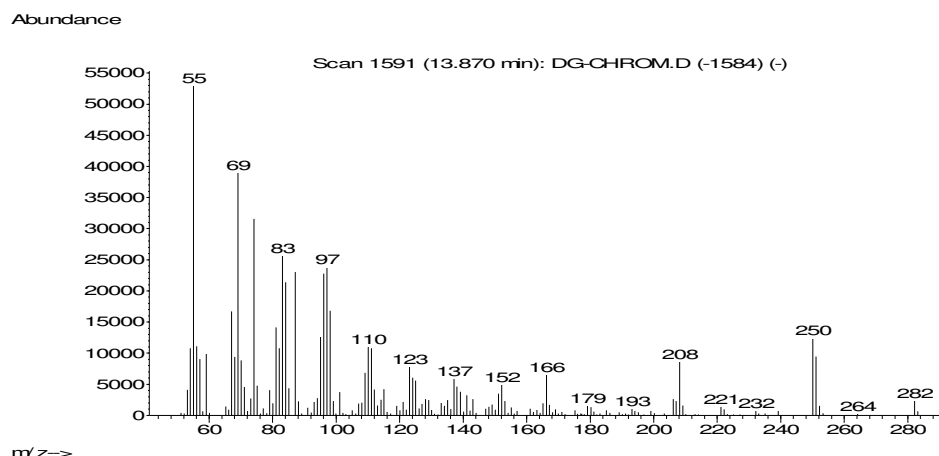


Рис 8. Масс-спектр цикло-гептадекановой (17сус) кислоты, молекулярный ион $M=282$. Специфический ион ряда M-32 (здесь ион $m=250$)

Существуют некоторые общие закономерности расположения пиков жирных кислот и альдегидов при анализе в виде Me-TMC производных на неполярных колонках и программируемом режиме анализа, которые иллюстрируются на рис 10 и 11. На рисунке 9 показана хроматограмма по полному ионному току гексанового экстракта метанолизата цельной крови больного. Она представляет мажорную группу ЖК форменных элементов и плазмы крови. Это пальмитиновая 12,54 мин, стеариновая 15,23 мин, пара ненасыщенных C18 кислот (олеиновая и линолевая) – около 14,92 мин, полиненасыщенные C20 кислоты во главе с арахидоновой 16,93 мин, полиненасыщенные докозеновые (C22:5 и другие) 19,26 мин, C24:0 и C24:1 около 22-й минуты, C22:6 24,00 мин, холестерин 26,52 мин

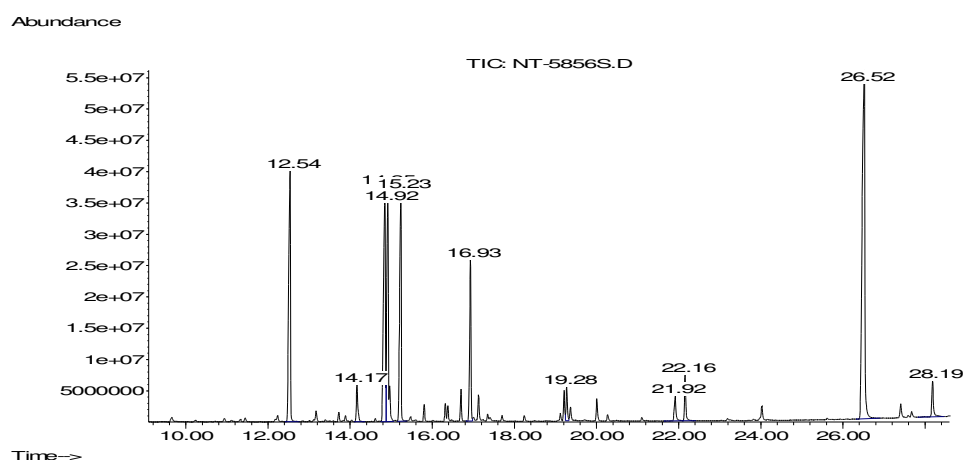


Рис.9. Хроматограмма гексанового экстракта метанолизата цельной крови больного. Снята в режиме полного сканирования в диапазоне масс 50-550.

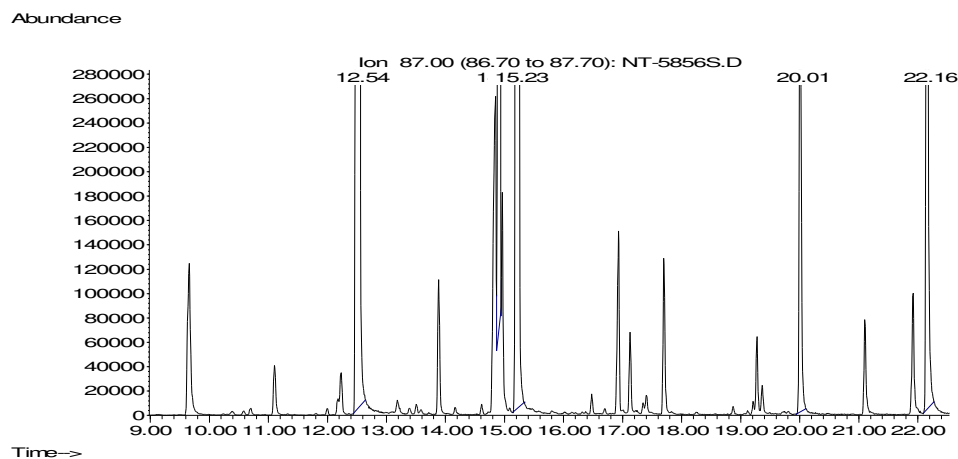


Рис. 10. Масс-хроматограмма по иону 87 (жирные кислоты) пробы крови. Насыщенные прямоцепочечные ЖК 14:0 - 9,6 мин; 15:0 – 11,1 мин; 16:0 12,54 мин; 17:0 – 13,9 мин; 18:0 – 15,23 мин; 19:0 – 16,5 мин; 20:0 – 17,7 мин; 21:0 – 18,9 мин; 22:0 – 20,01 мин; 23:0 – 21,1 мин; 24:0 – 22,16 мин

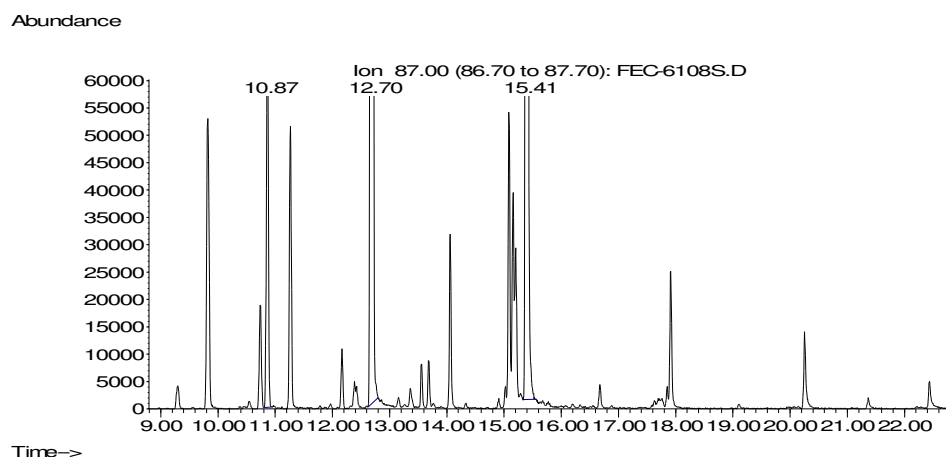


Рис. 11 Масс-хроматограмма по иону 87 (жирные кислоты) пробы гексанового экстракта метанолизата фекалий. Здесь удобнее показать разветвленные и ненасыщенные кислоты: i14 – 9,03 мин; i15, a15 – 10,8 мин; i16 – 12,2 мин; i17, a17 – 13,6 мин; i18 – 14,9 мин; 16:1 ω9 и ω7 – 12,4 мин; 18:2 – 15,1 мин; 18:1 ω9 – 15,15 мин; 18:1 ω7c – 15,20 мин

Нормальные прямоцепочечные ЖК образуют сетку маркерных пиков, которые выходят через равные промежутки времени. Их место при необходимости можно находить, пользуясь этой закономерностью и подтверждая молекулярным ионом и характерными линиями масс-спектра. Антеизо-кислоты выходят раньше нормальных на 0,35 мин, изо-кислоты на 0,5 мин, мононенасыщенные расположены между антеизо-кислотами и соответствующими им нормальными кислотами по оси времени. Оксикислоты появляются сразу после нормальной кислоты, которая на два атома углерода больше, чем сама оксикислота (рис 1). Причем 2h изомер сдвинут относительно 3h варианта на +0,05 мин). Оксилауриновые кислоты (h12) выходят спустя 0,3 мин после C14:0, у следующих кислот в ряду эта задержка уменьшается до

нуля для оксиоктадекановых кислот. 10-оксистеариновая ($m=273$) и 3-оксистеариновая ($m=175$) кислоты близки по времени выхода с C20:0. Общим для простых ЖК является ион 87, для оксикислот - ион 175, жирных альдегидов – ион 75.

Расчет концентрации маркеров и отнесение их к конкретным микроорганизмам проводят по программному комплексу, который состоит из метода сбора и обработки данных – файл формата method.m и перевод их в формат электронных таблиц EXCEL. Лист 1 таблиц содержит площади пиков масс-фрагментограмм с указанием иона, по которому они измерены. Численности микроорганизмов определяют по формулам с учетом возможного происхождения ЖК из клеток разных таксонов. А именно, площадь пика маркера пропорциональна его концентрации, следовательно, концентрации соответствующего микроорганизма, которая определяется как число клеток N_1 в единице объема или веса пробы по формуле:

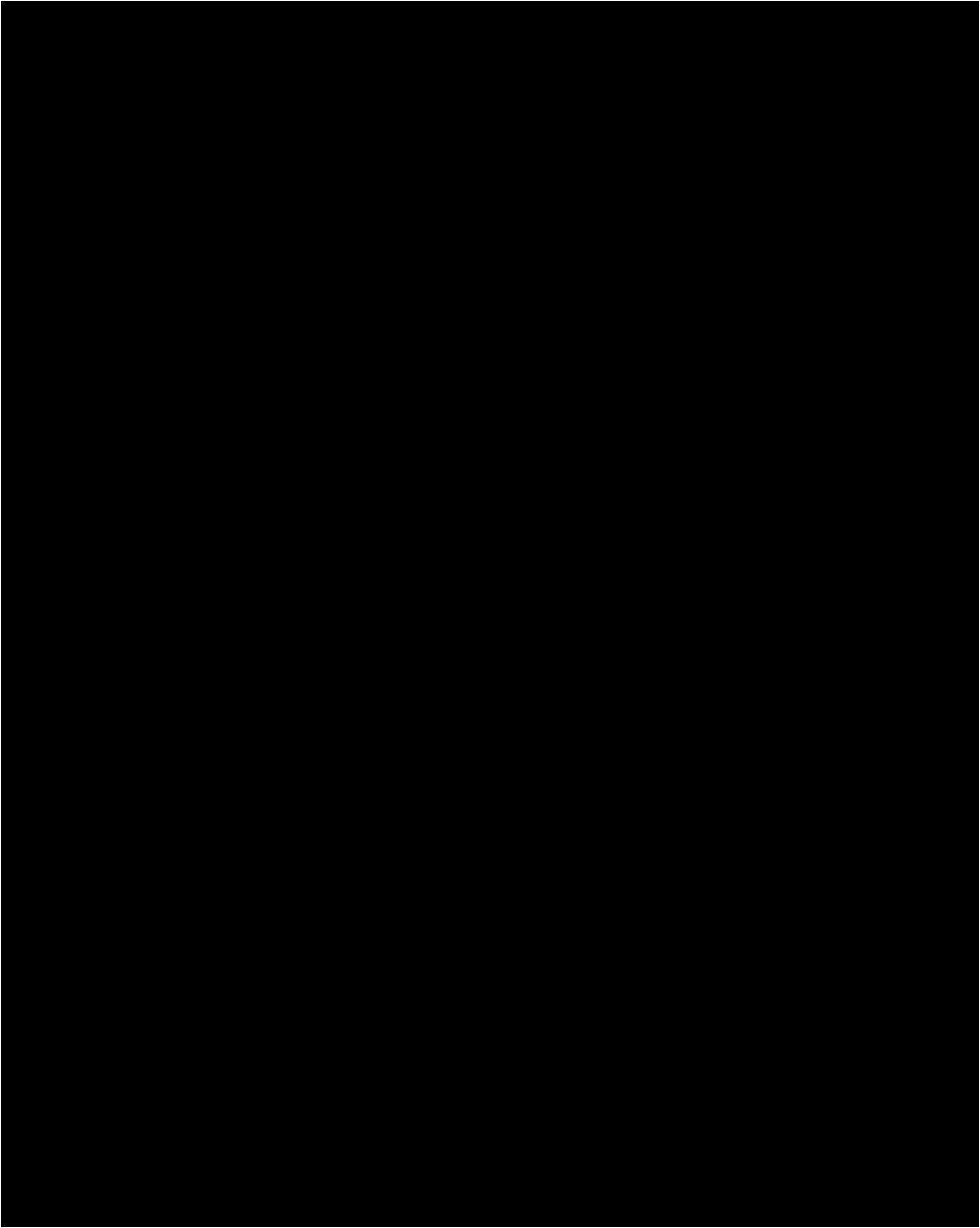
$N_1 = A_i [Mst / (q_2 \times M_{sam} \times A_{st})] / Ri_1$, где выражение в квадратных скобках, постоянный коэффициент:

$$k = Mst / (q_2 \times M_{sam} \times A_{st}) = Mst(\text{мг}) / (5,1 \times 10^{(-15)} (\text{г}) \times M_{sam}(\text{мг}) \times A_{st})$$

В этих формулах A_i – площадь пика маркера, Mst – количество введенного в пробу стандарта в мг, M_{sam} – количество пробы, A_{st} – площадь пика стандарта, Ri_1 – доля в % маркера с индексом i в профиле ЖК определяемого микроба с номером 1 (N_1), q_2 – коэффициент, равный $5,1 \times 10^{(-15)}$ г. При этом предполагается, что г микробной биомассы содержит $5,9 \times 10^{12}$ клеток бактерий, а содержание ЖК в клетке равно в среднем трем процентам.

Соответственно, число клеток любого следующего микроорганизма можно рассчитать по аналогичной формуле $N_2 = A_i \times k / Ri_2$ и так далее, умножая площади пика A_i маркера, по которому проводятся вычисления, на коэффициент k и деля на содержание маркера (в %) в составе ЖК этого микроорганизма. В микробном сообществе неизбежно наложение профилей жирных кислот составляющих его микроорганизмов, когда в определяемой концентрации вещества имеется вклад от двух или нескольких микробов. Суперпозицию можно разрешить путем составления для каждого целевого вещества хроматограммы уравнения вклада каждого микроорганизма, имеющего это вещество. Тогда для m веществ хроматограммы суммарной биомассы сообщества, включающего в качестве членов n родов (видов) микроорганизмов, можно составить систему из m уравнений для n неизвестных. Получится матрица, в которой каждое неизвестное есть численность одного из таксонов микробного сообщества. Система имеет практически приемлемое приближенное решение^{13,16}, которое приведено в виде системы формул в формате таблиц EXCEL.

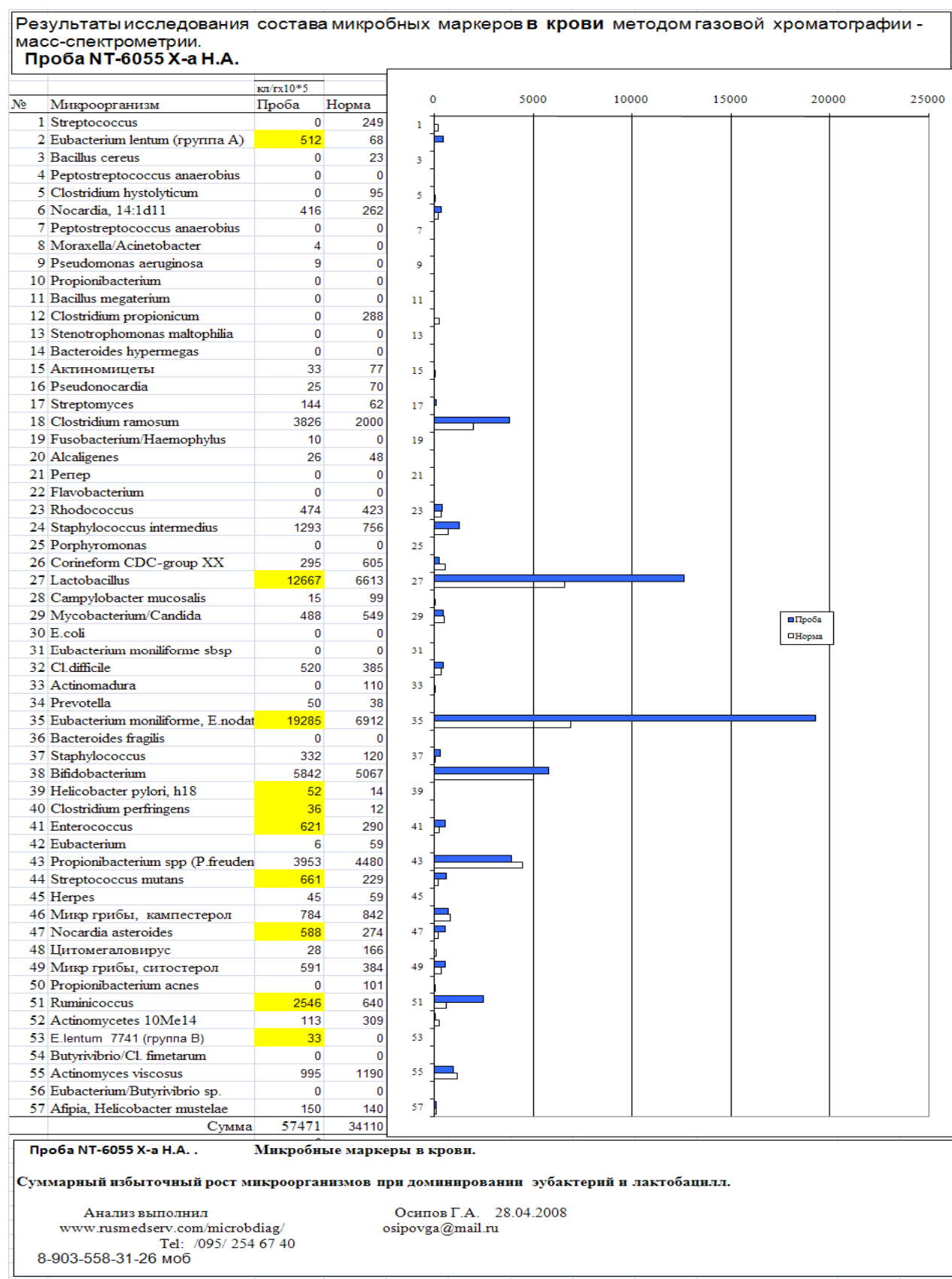
Лист 2 книги EXCEL – расчет по формулам имеет следующий вид:



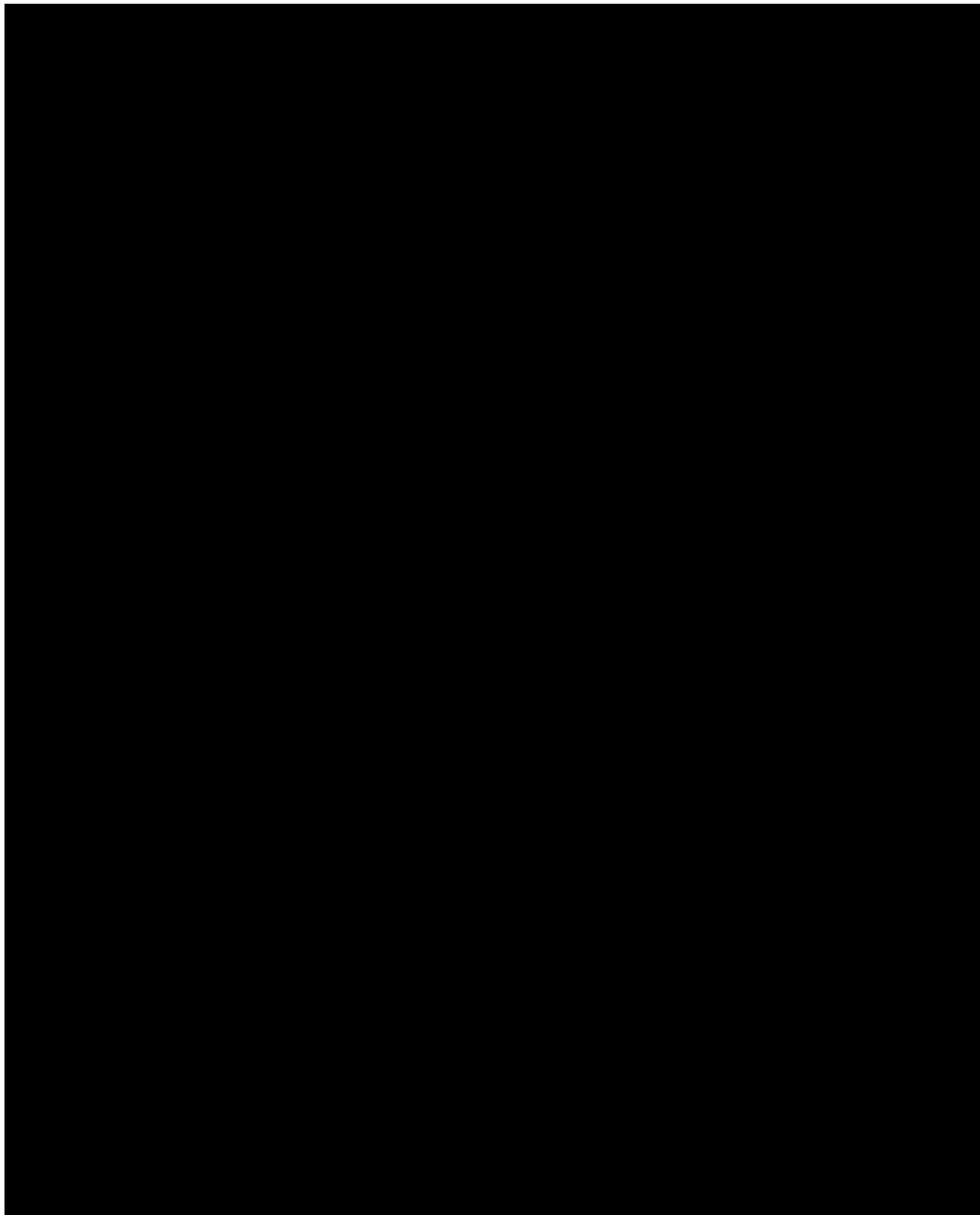
Такое представление позволяет, кроме получения необходимых количественных данных, контролировать баланс жирных кислот как критерий правильности решения, так и оперативно регулировать систему под изменения микробного сообщества локуса, избегая необходимости составлять и решать систему в каждом случае («живые формулы»). Практически было установлено, что для расчета клинических проб любого органа или очага воспаления

приведенная ниже система формул достаточно универсальна. Нюансы микробных сообществ удастся учесть применением шаблонных решений для общего микробиологического статуса (кровь, моча), генитальных секретов мужчин и женщин, слюны, ликвора, кожи.

Лист 3 - Конечный результат в сопоставлении с нормой.



Лист 4 - Конечный результат в виде диаграммы дисбиоза.



Вертикальная линия сетки с координатой "0" - норма. Отклонение в плюсовую сторону - избыточный рост микроорганизмов, в минусовую сторону - дефицит.

Количественные изменения некоторых микробных маркеров при заболеваниях различной этиологии показаны на хроматограммах (Рис. 12 - 14).

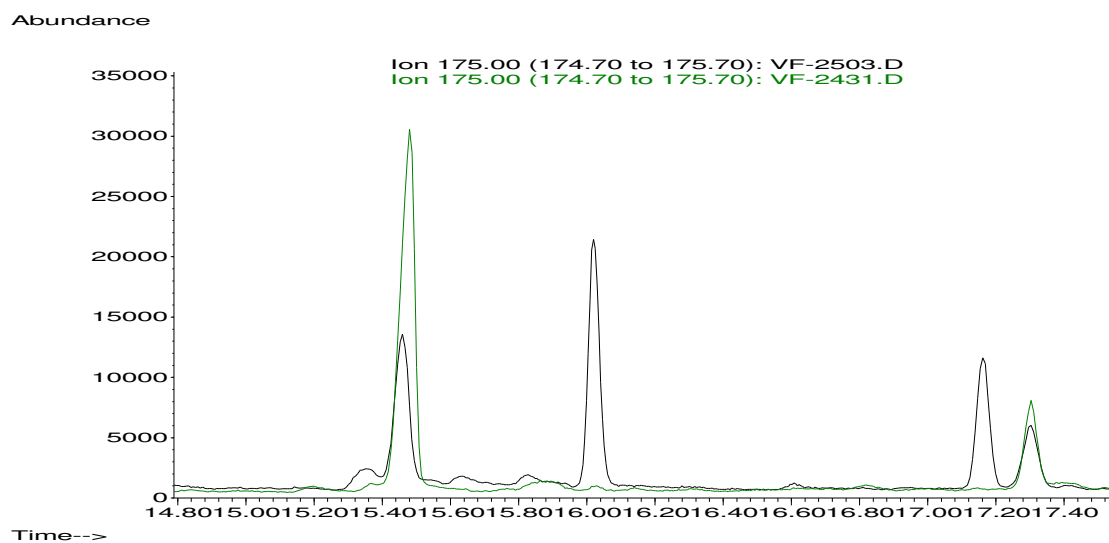


Рис. 12. Концентрация маркера сем. *Enterobacteriaceae* – β -оксимиристиновой кислоты (h14) – время по шкале абсцисс 16,02 мин – при заболевании (верхняя хроматограмма) по сравнению с нормой (нижняя хроматограмма). Вагинальная жидкость.

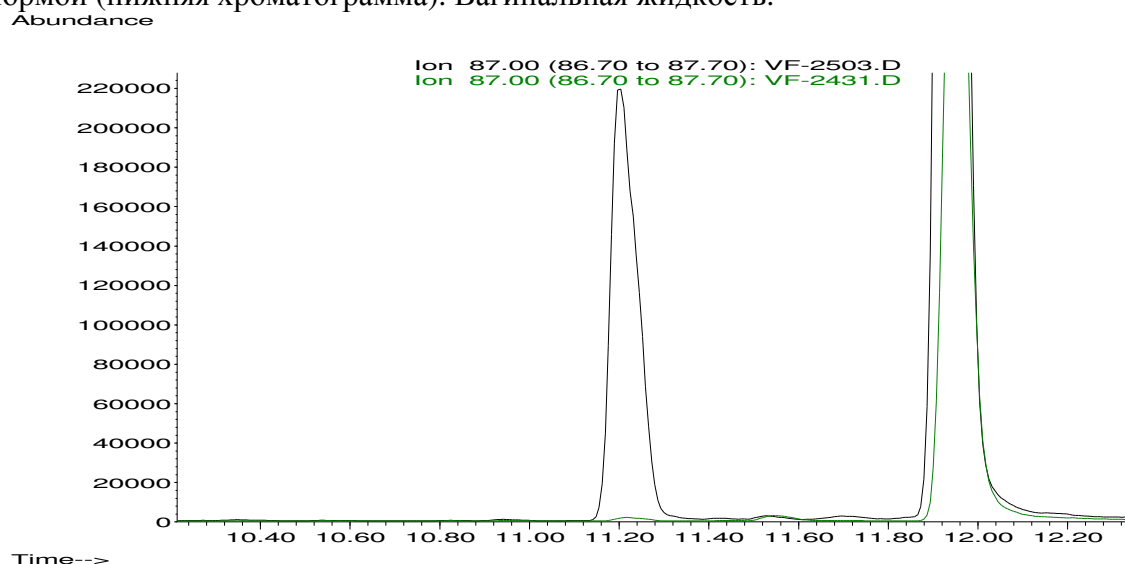


Рис 13. Маркер анаэробного пептострептококка – изо-миристиновая кислота, i14 (время выхода 11,23). Его концентрация возросла в 50 раз у больного по сравнению с уровнем нормы (нижняя кривая; большой пик справа – миристиновая кислота фона). Вагинальная жидкость.

V. Верификация метода

В пользу микробного происхождения жирных кислот, альдегидов и стероидов, не характерных для клеток организма человека, свидетельствуют следующие соображения и факты.

- Хорошо известно, что в клетках млекопитающих отсутствуют гидрокси-, циклопропановые и ненасыщенные ЖК

- В результате проведенных нами анализов (несколько тысяч) биологических жидкостей человека и животных было определено, что динамичное изменение состава минорных ЖК свидетельствует об их экзогенном происхождении
- Состав ЖК макроорганизма колеблется в пределах 25% от их среднего значения в разных пробах, а состав микробных маркеров от 0 до максимума в тяжелых случаях воспаления
- При проведении этиотропной антибактериальной терапии значения минорных компонентов в крови возвращались к нормальным
- Концентрация микробного маркера коррелирует с активностью воспалительного процесса (3-гидрокси-пальмитиновая кислота в крови как маркер *Brucella* в случае экспериментального бруцеллеза у морских свинок, 72 дневный курс)¹²
- Концентрация микробных маркеров *Salmonella* в крови пациентов с сальмонеллезом коррелирует со значениями титров антител¹²
- Концентрация 10-гидроксистеариновой кислоты (маркер *Clostridium perfringens*) пациентов с синдромом длительного сдавливания и диагнозом “газовая гангрена” коррелирует с наличием и количеством *C.perfringens*, подтвержденным культуральным методом⁶
- Наконец, клинические наблюдения показывают нормализацию микробиологического статуса организма человека и подавление инфекции в результате лечебных мероприятий по данным масс-спектрометрии микробных маркеров.

В качестве примера, подтверждающего специфичность маркера приведем результаты поиска маркеров *C.perfringens* при газовой гангрене⁶ (табл. 3).

Таблица 3

Сопоставление клинических, бактериологических и ГХ-МС данных диагностики клостридиальной инфекции в сравнении с контрольными

№	Фамилия, № и.б.	Клинический диагноз	Бактериологич. данные	Концентрация* 10-оксикилот		Летучие кислоты
				18:0	18:1	
1.	Г-н, 5229	Анаэробная клостридиальная флегмона	<i>C.perfringens</i>	2,4	0,0	масляная
2.	М-н, 5288	Газовая гангрена	<i>C.perfringens</i>	5,4	0,2	пропионовая масляная капроновая
3.	М-н, 5272	Газовая гангрена	Клостридии	7,8	0,0	масляная валериановая капроновая
4.	П-н, 5248	Анаэробная клостридиальная флегмона	Клостридии	5,6	6,2	пропионовая изомасляная масляная
5.	Т-н, 5261	Анаэробная флегмона	Клостридии	22,1	2,0	масляная валериановая
6.	Г-н, 5234	Костная посттравматическая рана	Стафилококк	0	0	масляная энантовая
7.	О-ва, 5256	Анаэробная	Энтерококк,	0	0	отсутствие

		неклостридиальная флегмона	синегнойная палочка, протей			
8.	Здоровая ткань	Послеоперационный материал ткани бедра	Не инфицирована	0	0	отсутствие
9.	Б.	Пептококковая инфекция	Пептококк	0	0	уксусная пропионовая масляная изовалериановая

Экспериментальные данные показывают, что 10-оксикислоты C18 появляются лишь у тех пациентов, у которых бактериологический анализ обнаруживает присутствие клостридий, а клиническая картина соответствует газовой гангрене. В здоровых тканях, а также в тканях с неклостридиальной анаэробной инфекцией эти кислоты отсутствуют. Все изученные виды клостридий при инфицировании животных вырабатывают 10-оксидекановые кислоты, но вид *C.perfringens* в несколько раз более активен.

Проведено также тестирование метода масс - спектрометрии микробных маркеров по фекалиям, поскольку микробиота фекалий подробно изучена^{7,8,69,70}. Лидирующим в количественном отношении, по нашим данным, оказался род *Eubacterium*. Далее по ранжиру следуют клостридии, бактероиды, лактобациллы и бифидобактерии. Их доля составляет 84-94% от суммы по данным МСММ. Аэробы представлены в основном кокками разных таксонов, аэробными актиномицетами (актинобактериями) и микроскопическими грибами. Энтеробактерии, псевдомонады, другие грамотрицательные аэробы и вирусы присутствуют в минорных концентрациях. Данные по микробному сообществу фекалий получены у практически здоровых людей разного пола и возраста. Оказалось, что количественный состав микроорганизмов и их сумма резко индивидуально различны. Вариации по сумме составляют порядок, а по отдельным микробам до двух порядков и более. Например, разница на порядок по бифидобактериям, на два порядка по лактобациллам, на 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 микробиоты 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. Данные МСММ подтверждают известные, но сразу по всем микроорганизмам фекалий в одном анализе и с большой точностью по сравнению с культуральным и, пожалуй, генетическим (FISH) методами (табл. 5).

Таблица 5

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

	Состав микробиоты фекалий взрослых людей, клеток/г мокрого веса				
	Масс- спектроме- трия	Генетический метод, Harmsen, 2002	Культуральный метод		
			Бондаренко, 2003	Маянский (Schaechter)	Фирма Hoechst
Общая численность	$0,6-5 \times 10^{11}$	$3,5 \times 10^{10}$	$10^{10} - 10^{11}$	$10^{10} - 10^{12}$	2×10^{11}
Доля анаэробов, %	84-94	До 100	90-95	До 100	33-100
<i>Eubacterium</i>	10^{11}	$7,1 \times 10^9$	$10^9 - 10^{10}$	$10^9 - 10^{12}$	3×10^{10}
Бактероиды	10^{10}	$9,5 \times 10^9$	$10^9 - 10^{10}$	$10^{10} - 10^{12}$	10^{11}
Клостридии	6×10^{10}	$7,9 \times 10^9$	$10^5 - 10^8$	$10^5 - 10^{11}$	3×10^{10}
Бифидобактерии	10^{10}	$1,7 \times 10^9$	$10^9 - 10^{10}$	$10^8 - 10^{12}$	2×10^8

Полученная методом ГХ-МС общая численность микроорганизмов фекалий находится в пределах интервала значений $0,6-5 \times 10^{11}$ 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 трех-шести 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 бактериоидов 10^{10} кл/г ($10^{10} - 10^{12}$ по известным данным), клостридий - 6×10^{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 микроорганизмов дает достоверные данные об их численности. Следовательно, можно считать так же достоверными результаты измерений численности микроорганизмов в биоптатах кишечной стенки и других клинических пробах.

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 бактериоидов в сопоставлении с долей условно-патогенной микрофлоры при исследованиях дисбактериозов. Как видно из поля зрения микробиолога при этом выпадают

эубактерии, бактериоды 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 исследования. Данные масс-спектрометрии коррелируют с генетическими (в рамках сопоставимости микробиологических количественных измерений) и одинаково показывают, что эубактерий, бактериодов и клостридий вместе и по отдельности на порядок больше, чем бифидобактерий.

VI. Клинические приложения метода

1. Кишечник

При ГХ-МС исследовании фракций ЖК в биоптатах кишечной стенки и пробах крови практически здоровых людей и пациентов с дисбактериозами найдено, что основными компонентами (на уровне относительного содержания более 1%) 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, альдегиды и 2-оксикислоты. 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, не характерные для макроорганизма. Хроматограммы, полученные по методу селективных ионов, позволяют уверенно детектировать микробные компоненты на фоне преобладающих компонентов слизистой кишечника (рис 1).

Концентрация микробных маркеров, следовательно, и соответствующих им микроорганизмов пристеночного слоя кишечника (табл. 5, Рис 14 – круговая диаграмма таксонов) 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)⁷¹. По данным табл. 5 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. Интересно отметить, что концентрация *S. perfringens* на три порядка меньше в пристеночном слое как ободочной, так и подвздошной

кишки, чем в фекалиях, но снова увеличивается в тощей. Это означает практически, 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 в кишечной стенке, а *Campylobacter mucosalis* – только в фекалиях.

Таблица 5.

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				
<i>Streptococcus (Lactococcus)</i>	261	253	1170	1691
<i>Bacillus cereus</i>	0	51	157	284
<i>Bacillus megaterium</i>	90	0	0	0
<i>Corineform (Listeria) a17</i>	1398	439	713	65
<i>Staphylococcus</i>	616	410	490	121
<i>Streptococcus</i> (оральные)	1642	127	2	641
Сумма	4006	1281	2533	2803
Анаэробы				
<i>Eubacterium lentum</i>	98	675	670	4334
<i>Clostridium hystolyticum</i>	692	467	849	388
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	487	330	423	37
<i>Clostridium propionicum</i>	1237	150	0	13942
<i>Bacteroides hypermegas</i>	0	0	0	163
<i>Clostridium ramosum</i>	3892	1942	118	0
<i>Fusobacterium</i>	0	0	0	129
<i>Porphyromonas</i>	0	0	0	39
<i>Lactobacillus</i>	17355	17190	16231	30510
<i>Eubacterium moniliforme</i>	0	0	0	892
<i>Cl. difficile</i>	1769	861	1055	684
<i>Prevotella</i>	620	583	345	7557
<i>Eubacterium</i> (основная группа)	6832	11497	24457	12026
<i>Bacteroides fragilis</i>	0	63	43	1340
<i>Bifidobacterium</i>	5249	7108	31886	10723
<i>Clostridium perfringens</i>	224	50	43	44698
<i>Eubacterium</i>	27	1548	3549	93218
<i>Propionibacterium (P. freudenreichii)</i>	12777	1057	13086	3648
<i>Propionibacterium acnes</i>	0	0	359	388
<i>Ruminococcus</i>	804	800	1364	30
<i>E. lentum 7741</i>	93	56	0	282
<i>Bacteroides ruminicola</i>	0	7	9	2769

<i>Eubacterium spp.</i>	365	265	5650	9725
<i>Propionibacterium</i>	0	0	0	698
Сумма	52520	44648	100138	238219
Аэробные актиномицеты				
<i>Nocardia sp.</i>	1595	0	1136	7
Актиномицеты	797	289	105	0
<i>Pseudonocardia</i>	215	7	85	34
<i>Streptomyces</i>	493	392	329	1522
<i>Rhodococcus</i>	1588	792	698	127
<i>Mycobacterium/Candida</i>	3025	3184	3257	0
<i>Actinomadura</i>	151	0	12	0
<i>Nocardia asteroides</i>	1782	0	609	108
<i>Actinomycetes 10Me14</i>	3652	3196	2328	92
Сумма	13297	7859	8558	1891
Грам (-) палочки				
<i>Acinetobacter</i>	0	0	0	125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	42
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	0	0	24
Сумма	0	0	0	191
Энтеробактерии и энтерококки				
<i>Alcaligenes</i>	146	261	190	84
<i>Campylobacter mucosalis</i>	0	0	0	18
<i>E.coli</i>	20	21	25	0
<i>Helicobacter pylory</i>	529	141	92	2134
<i>Enterococcus</i>	783	484	1252	669
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	530	4649
Сумма	1478	907	2089	7554
Микроскопические грибы				
Микромицеты (кампестерол)	216	375	112	1430
Микромицеты (ситостерол)	197	422	56	888
Микромицеты (эргостерол)	0	0	0	286
Сумма	413	797	168	2604
Вирусы				
Герпес	216	113	203	0
Цитомегаловирус	919	31	26	8
Сумма	1135	144	230	8
Не идентифицированы				
Маркер i14	0	840	92	15192
Маркер i17	3066	1549	0	2061
Сумма	3066	2389	92	17253
Общая сумма	75915	57772	112637	270523

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 мы вправе делать прямые доступные нам 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 $(0,5-1,3) \times 10^{11}$ кл/г в зависимости от отдела кишечника (табл. 5).

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 (по литературным данным⁶⁹), 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 фекалий⁷⁰. 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 актиномицеты – 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%.

Неожиданным результатом, несомненно, является обнаружение значительного количества аэробных актиномицетов. Специфичность их маркеров - разветвленных жирных кислот с метильной группой в положении $\Delta 10$ не позволяет предполагать какие-либо иные таксономические группы микроорганизмов, кроме представителей порядка *Actinomycetales*, содержащих в составе клеточной стенки миколовые кислоты, которые являются источником 10Me-разветвленных ЖК. Они содержатся в микобактериях, нокардиях, родокках, *Actinomadura* spp. и других актиномицетах, но не найдены у высших организмов (в грибах, растениях, животных). Присутствие этих молекул в биоптатах кишечника, крови и других органах и жидкостях человека подтверждается масс-спектрами в хроматографическом пике и относительным хроматографическим временем удерживания, 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, профиль разветвленных ЖК, специфичных для стрептомицетов, выявлен в крови септических больных⁷², а *Nocardiopsis dassonvillei* выделен в чистой культуре из кишечника⁷¹. Список актиномицетов, на самом деле, шире, чем это показано в первой группе табл. 5. Сюда следует добавить анаэробные актиномицеты и близкие к ним микроорганизмы. Это *Propionibacterium*, *Actinomyces*, *Brevibacterium*, которые также выделены в чистой культуре и коринеформные бактерии. Наконец, если учесть, что до настоящего времени в некоторых руководствах по микробиологии, как и ранее⁷³, род *Bifidobacterium* относят к семейству *Actinomycetaceae*, то окажется, что актиномицеты филогенетически близки к традиционно известным представителям пристеночной микробиоты кишечника. С ними возрастает 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 помещений⁷⁴. 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. Они известны (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. 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.

Итак, 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 (ЖК) 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 по длине кишечника. 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 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 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. 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.

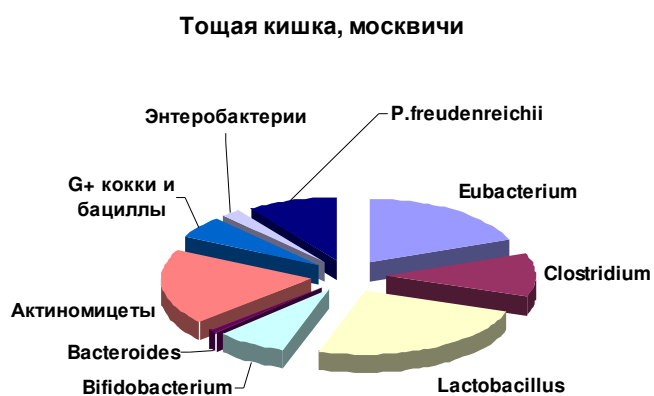


Рис. 14. Состав доминантных родов и групп микроорганизмов из микробоценоза жителей г.Москвы. Измерено по микробным маркерам в биоптатах тощей кишки.

Москвичи (маркеры в крови)

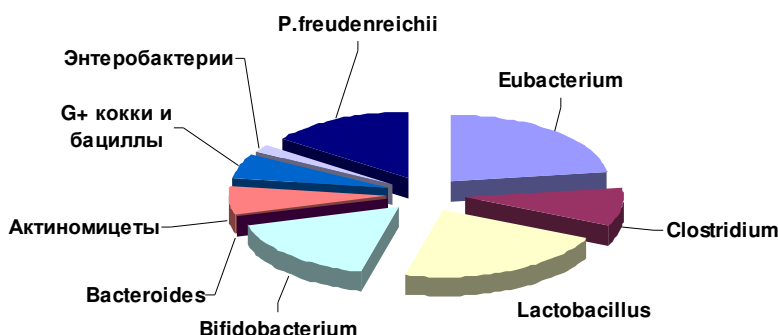


Рис. 15. Состав доминантных родов и групп микроорганизмов из микробиоценоза жителей г.Москвы. Измерено по микробным маркерам в крови.

Обнаруженный в результате систематических исследований гомеостаз микробных маркеров в крови^{75,76} и адекватность его профиля составу кишечной микробиоты здорового человека (рис. 15) обеспечил уникальную возможность мониторировать состояние микробиоты кишечника неинвазивным экспрессным методом – по анализу крови⁷¹. Поскольку в кровь попадают также липидные компоненты отмирающих микроорганизмов из других органов, то его можно считать экспрессным методом определения микрoэкологического статуса высших организмов.

2. Нозологическая специфичность дисбактериоза кишечника

Наблюдение за микробиотой тонкого кишечника при четырех кожных заболеваниях – себорея, акне, атопический дерматит, алопеция дает подтверждение предположению Шендерова Б.А. о том, что «Существует столько вариантов дисбаланса микробиоценозов человека, сколько известно нозологических форм заболеваний», то есть о нозологической специфичности дисбактериоза кишечника⁷⁷. Увидеть это помогает графическое сопоставление дисбактериоза при упомянутых заболеваниях и при синдроме раздраженного кишечника для дополнительного сравнения (рис 16-19)⁴⁰.

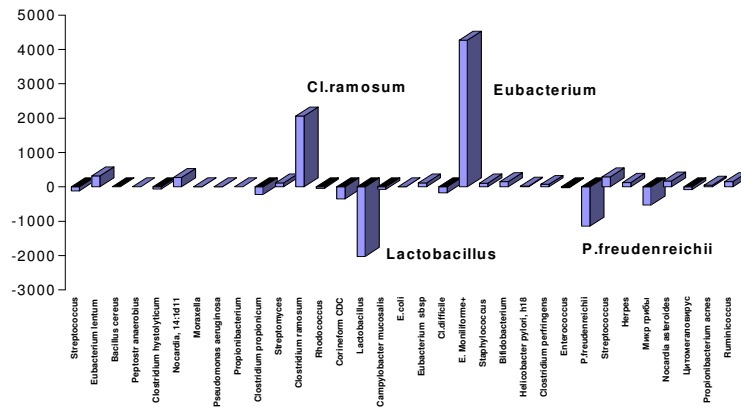


Рис 16. Себорея. У больных себорейным дерматитом при дефиците лактобацилл и пропионобактерий в кишечнике высока концентрация маркеров кластридий группы *C. ramosum* и видов *Eubacterium*

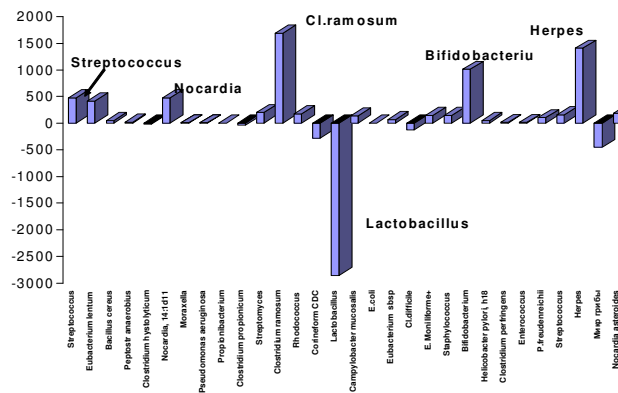


Рис 17. Угревая болезнь. При угревой болезни (акне) наблюдается дефицит лактобацилл при избыточном росте кластридий группы *C. ramosum*, бифидобактерий, вирусов герпеса и других микроорганизмов

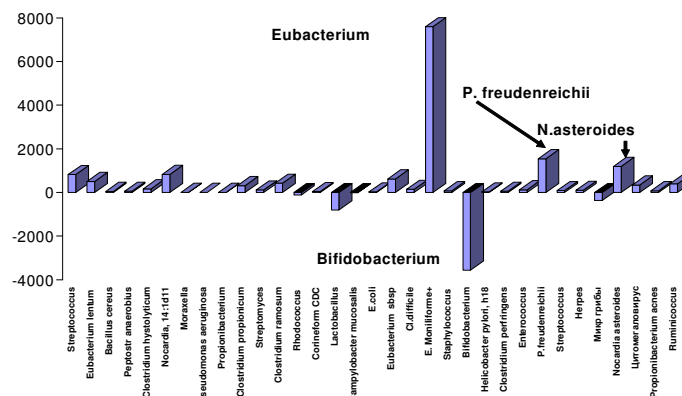


Рис 18. Атопический дерматит. При атопическом дерматите в кишечнике регулярно обнаруживается дефицит бифидобактерий при избыточном росте видов *Eubacterium*, *Propionibacterium freudenreichii*, нокардий и других микроорганизмов

При атопическом дерматите в микробиоте пристеночного слоя кишечника (посредством измерения микробных маркеров в крови) обнаружили дефицит бифидобактерий при избыточном росте видов *Eubacterium*, *Propionibacterium freudenreichii*, нокардий и других микроорганизмов.

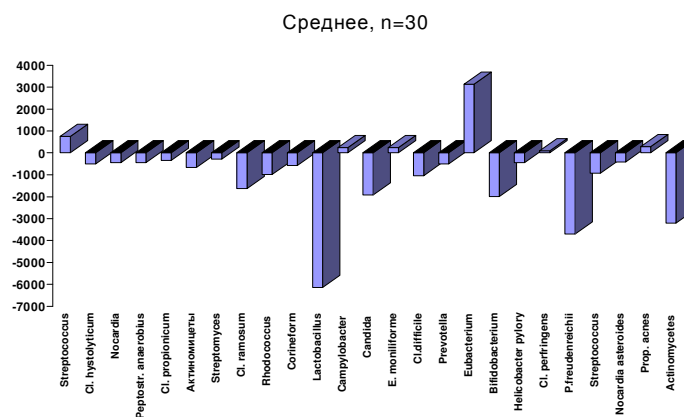


Рис 19. При синдроме раздраженного кишечника наблюдается тотальный дефицит кишечной микробиоты до семикратного снижения общей численности микроорганизмов при избыточном росте зубактерий и стрептококков.

Метод масс-спектрометрии микробных маркеров, благодаря своей экспрессности и информативности, позволил получить экспериментальные данные, подтверждающие связь ряда заболеваний с изменением микроэкологического статуса организма. Эти данные согласуются с известными данными о связи микробиоты кишечника с кожными заболеваниями⁷⁸. Более того, они позволяют узнать существо изменений микробиоты, причем, именно тонкого кишечника, а не фекалий, как это делалось в предыдущих исследованиях. Для практического врача это означает возможность усовершенствования тактики лечения больных за счет выбора этиотропных антибиотиков для подавления избыточного роста (инфекции) части микробиоты и стимулирования размножения дефицитной группы микробов.

3. Реабилитация

Одним из последствий стрессовых воздействий на организм человека является нарушение, порой устойчивое, обмена веществ в организме как следствие изменений микрофлоры кишечника и ассоциированной с ними проницаемости кишечной стенки. 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 процессов⁷⁷.

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 (бойцы горячих точек, эвакуаторы, ликвидаторы аварий и другие), должен быть контроль и восстановление микробиоценоза, если он оказался нарушенным.

На рубеже XXI века сформировалось представление о микрофлоре организма человека как о еще одном «органе», покрывающим в виде «чулка» кишечную стенку, другие слизистые оболочки и кожу человека. Оставаясь невидимым, этот «орган» весит около двух килограммов и насчитывает порядка 10^{14} клеток (сто миллиардов) клеток микроорганизмов. Это число в десять раз превышает число собственных клеток организма-хозяина^{71,77}.

При обследовании пациентов с подозрениями на изменение микроэкологического статуса (кишечные или кожные проблемы, аллергия, сепсис, лихорадка неясного генеза и прочее) выявлены следующие типы изменений нормальной микробиоты организма пациентов.

- Избыточный рост микроорганизмов, общий или частичный
- Тотальный дефицит
- Разнополярные изменения отдельных составляющих микробиоты
- Появление нехарактерных для нормы групп микроорганизмов

Эти изменения соответственно адекватны изменению пула химических веществ, поступающих к хозяину от микробиоты.

Типовой вид результатов обследования на микроэкологический статус методом масс-спектрометрии микробных маркеров показан на рис. 20.

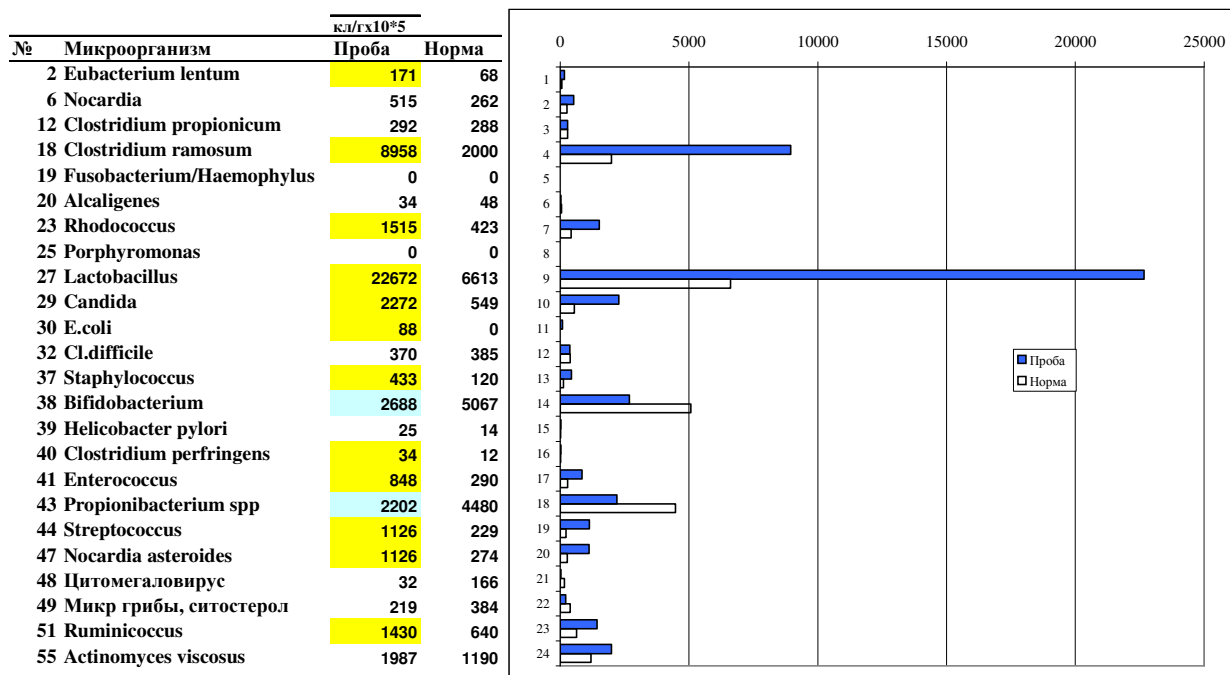


Рис.20. Сепсис у больной А (проба NT-530). Доминируют маркеры *Clostridium ramosum* и лактобацилл при дефиците пропионобактерий, бифидобактерий и других микроорганизмов нормальной микробиоты. Клинически значимый уровень превышают маркеры дрожжей кандиды, стрептококков, руминококков, бактерий сем. *Enterobacteriaceae* (*E. coli*), актинобактерий *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Nocardia asteroides* и *Eubacterium lentum*.

4. Синдром раздраженной кишки

При синдроме раздраженного кишечника наблюдается тотальный дефицит кишечной микробиоты до семикратного снижения общей численности микроорганизмов преимущественно за счет уменьшения численности лактобацилл, бифидобактерий, основной группы эубактерий и пропионобактерий при избыточном росте эубактерий и стрептококков.⁷¹. Кроме того, растет численность анаэробов *Bacteroides fragilis*, *Porphyromonas*, *Propionibacterium acnes*, при периодическом избытке энтеробактерий, кластридий 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. В переводе на общепринятый язык ее можно определить как группу условно-патогенных микроорганизмов. В таком случае разумно говорить об антибиотикотерапии при СРК, хотя это выглядит на первый взгляд абсурдным. В действительности, назначение полусинтетических пенициллинов и сульфамидамов параллельно с сухими пробиотиками оказывается эффективным. Однако выборочные контрольные анализы (метод МСММ эффективен в мониторинге и коррекции лечебных мероприятий) после лечения показывают, что микробиота кишечника восстанавливается лишь на 50%. Добавление в терапию метронидазола, повышает эффект. Эффективность пары

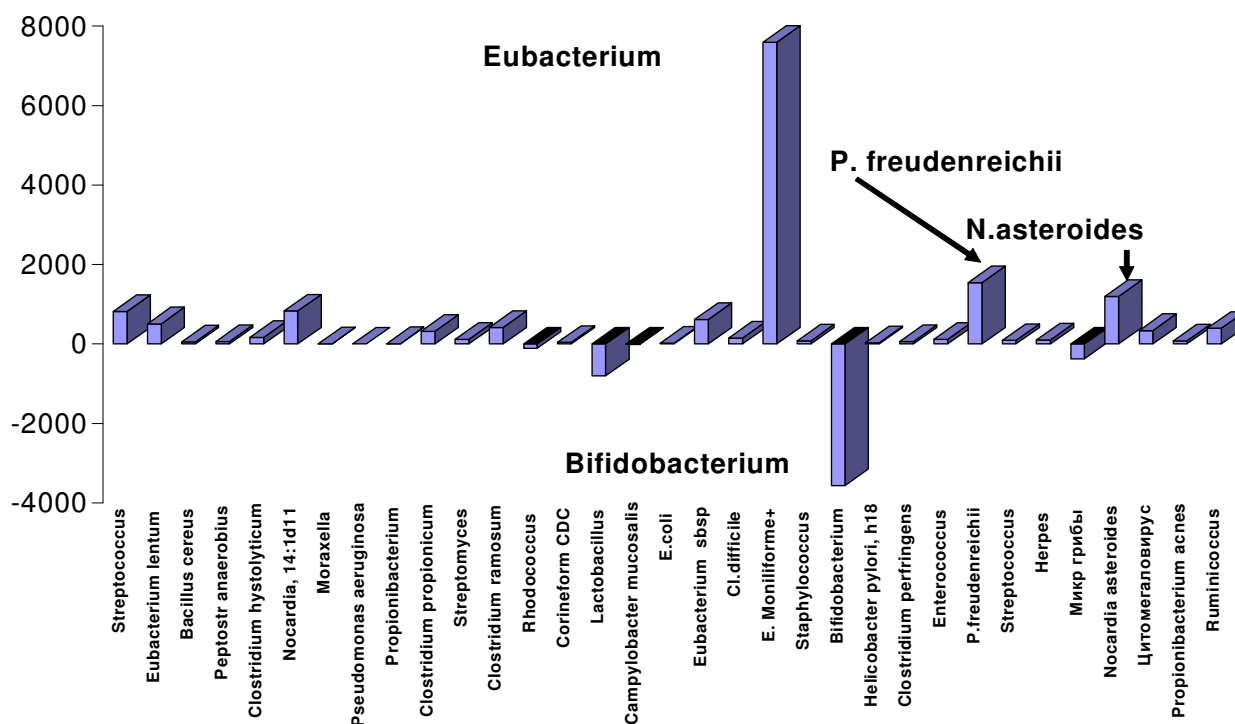
амоксциллин-метронидазол отмечена при избыточном росте анаэробных бактерий (эубактерии, пропионобактерии, клостридии и другие). В пяти клинических случаях было показано, что монотерапия метронидазолом стимулирует рост нормальной микрофлоры тонкого кишечника. Прием этого препарата в течение времени и доз, указанных в аннотации, не показал по данным ГХ-МС анализа угнетения остальной части полезной микрофлоры кишечника.

5. Муковисцидоз

Работа по определению состава микроорганизмов в мокроте больных муковисцидозом проведена в отделении муковисцидоза Российской детской клинической больницы (80 пациентов). Это исследование, задуманное с целью выявления анаэробной составляющей в мокроте пациентов, показало, что наряду с традиционно известными агентами муковисцидоза – псевдомонадами, стафилококками и другими микроорганизмами в мокроте обнаруживаются маркеры анаэробов родов *Clostridium*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Actinomyces* и других, причем, анаэробы доминируют в микст-инфекции.

6. Пиелонефрит

Проведена реконструкция микст-инфекции при пиелонефрите по микробным маркерам в моче детей Детской городской клинической больницы № 13 им. Н.Ф.Филатова (Москва, 60 пациентов). В ходе исследования было показано, что в моче доминируют маркеры анаэробов *Propionibacterium freudenreichii*, клостридий *Clostridium hystolyticum*, *C. ramosum* и *C. propionicum*, специфичных для кишечника, и значительно повышена концентрация маркеров *Alcaligenes*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Moraxella*. Кишечные микробы создают мукус повышенной (в присутствии *P. freudenreichii*) вязкости, способствующий размножению многочисленных видов микроорганизмов и физически препятствующий обменным процессам.



7. Сепсис и инфекция в области хирургического вмешательства

При септических состояниях, лихорадках, как правило, неясного генеза, чаще происходит избыточный рост ряда микроорганизмов из состава нормальной микробиоты хозяина, что по определению является инфекцией⁷⁹. Общим признаком этой части пациентов является более чем двукратное превышение в крови концентраций маркеров стафилококков, клостридий группы *Clostridium ramosum*, энтерококков, лактобацилл, *Eubacterium lentum* (*Eggertella lenta*) и дрожжей кандиды. Наибольший прирост численности бактерий приходится на *C. ramosum* и лактобациллы. К частным признакам относится прирост численности основной группы эубактерий (*Eubacterium moniliforme*, *E.nodatum*, *E.sabureum*), который наблюдается не у всех пациентов. Частично участвуют в инфекционном процессе грамотрицательные микроорганизмы сем. *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Proteus*, *Klebsiella* и другие). Реже уровень клинической значимости превышали маркеры псевдомонад, моракселл, *Fusobacterium/Haemophilus*, *Selenomonas*, *Helicobacter pylori* и *Prevotella*. Другие грамотрицательные бактерии, такие как представители родов *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Neisseria*, *Bacteroides*, *Burkholderia*, *Francisella* не превышали уровня клинической значимости или предела детектирования. У больных с раневой инфекцией или сепсисом наблюдали общий избыточный рост микробиоты по оценке микрoэкологического статуса, при том обстоятельстве, что численность части микроорганизмов почти у всех обследованных снижалась более чем в два раза по сравнению с нормой. Это относится, прежде всего, к бифидобактериям, пропионобактериям, энтерококкам и *Clostridium propionicum*. В некоторых

случаях значимые снижения концентраций отмечены для лактобацилл, эубактерий, коринебактерий и микроскопических грибов (не из рода кандиды).

Что касается инфекционной составляющей, то она, как и следовало ожидать, наилучшим образом выявляется при анализе материала из очага инфекции: соскоба, пунктата, экссудата. Если очаг закрыт, то информацию можно получить и из анализа крови. Сопоставление результатов двойного анализа – раневого экссудата и крови - для больного с инфекцией в области хирургического вмешательства после удаления селезенки представлено на рис 21.

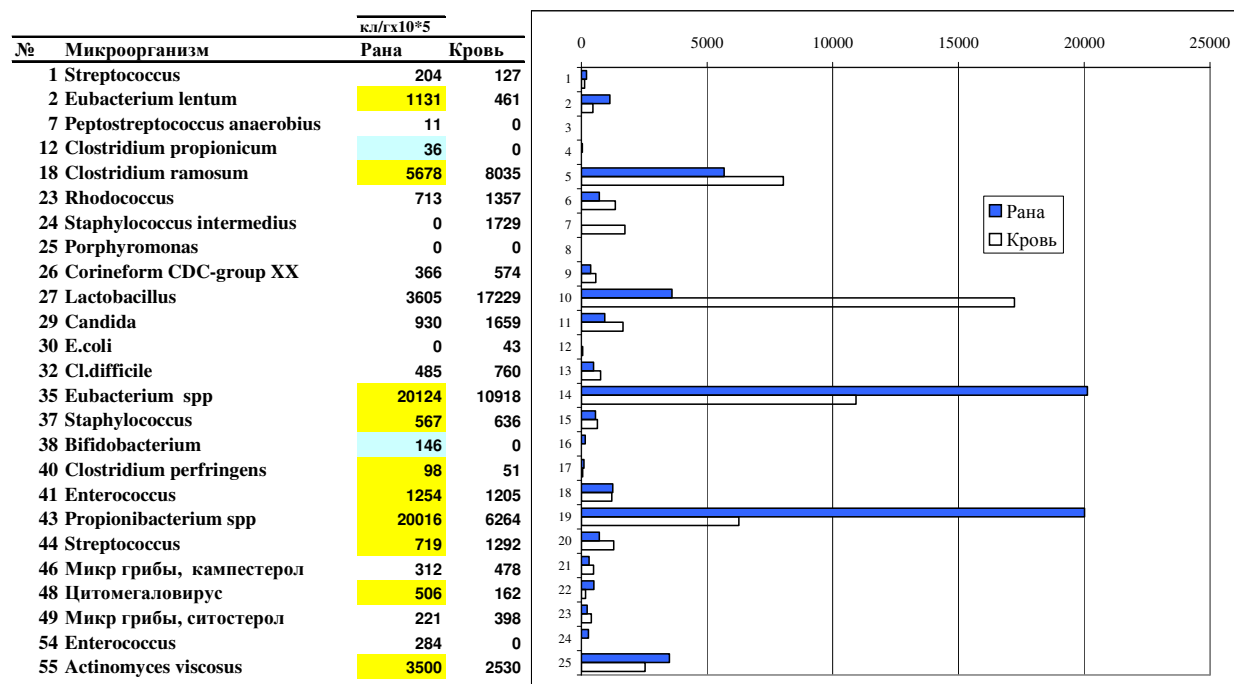


Рис. 21. Сопоставление результатов двойного анализа – раневого экссудата и крови - для больного с инфекцией в области хирургического вмешательства после удаления селезенки.

Как видно из рисунка, ведущими микроорганизмами (около 90% в раневом экссудате) являются анаэробы. Это клостридии *C. ramosum* и *C. perfringens*, пропионобактерии *P.freudenreichii*, эубактерии *Eubacterium moniliforme*, *E.nodatum*, *E.sabureum*, *E. lentum* и анаэробный актиномицет *Actinomyces viscosus*. Все они составляют нормальную (индигенную) микробиоту организма человека. Им сопутствует группа кокковых бактерий: стафилококки, стрептококки, энтерококки, которые обычно выявляют при классическом бактериологическом исследовании. Их доля в данном примере около 6%. Выше нормы концентрация микроскопических грибов кандиды, актинобактерий *Streptomyces*, *Nocardia*, *Rhodococcus* и других, на долю которых приходится 7% общей инфекции. Минорную группу составляют грамотрицательные микроорганизмы: *Moraxella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Fusobacterium*, *Alcaligenes* и *Helicobacter pylori*. Маркеров бактерий сем. *Enterobacteriaceae* в экссудате не обнаружено (менее 10⁵ клеток/мл).

У больного с септическим менингитом, развившимся в результате черепно-мозговой травмы, в ликворе найдено 23 таксона микроорганизмов, маркеры которых имеют клинически значимое (более чем в два раза) превышение нормы. Обнаружено, что ведущими микроорганизмами воспаления мозга являются клостридии группы *C. ramosum*, а также *C. propionicum* и *C. histolyticum*. Вычисленная по концентрации их маркеров численность самих микроорганизмов в зоне ликвора составляет 9×10^8 клеток/мл. На втором уровне микстинфекции представлены актинобактерии (аэробные актиномицеты) родов *Rhodococcus*, *Pseudonocardia* и не идентифицированные виды, а также *Eubacterium* стафилококки, пропионобактерии, дрожжи кандиды и микроскопические грибы. Их уровень концентрации имеет порядок 10^7 . На порядок ниже, но тоже с избыточным ростом обнаруживаются маркеры бактерий сем. *Enterobacteriaceae*, превотелл, золотистого стафилококка, клостридий перфрингенс, хеликобактера, энтерококков, стрептококков, вирусов и анаэробных актиномицетов *Actinomyces viscosus*. Не обнаружены (менее 10^5) анаэробный пептострептококк, синегнойная палочка и бактериоиды.

Из экспериментальных данных следует, что измерение микробных маркеров *in situ* выявляет новую группу микроорганизмов из числа трудно культивируемых, и поэтому, мало известных в клинической практике. Эти участники септического или раневого инфекционного процесса - клостридии, эубактерии, лактобациллы, хеликобактеры, стрептомицеты, родококки - обладают высокой патогенетической активностью. Она известна из специфически связанных с этими организмами нозологий, каждая из которых воспринимается сама по себе как серьезное заболевание, трудно поддающееся лечению. Клостридии групп *C. perfringens* и *C. ramosum* (группа RIC – *ramosum, inocuum, clostridioforme*) – это гангрена, *Eubacterium* – септический артрит, *Lactobacillus* – септицемия и эндокардит, *H. pylory* – язвенная болезнь желудка, языка и атеросклероз; *Streptomyces* и другие актинобактерии - туберкулез, нокардиозы и актиномикозы. Токсигенные штаммы *Streptomyces* выделяют токсин валиномицин, разрушающий митохондрии клеток млекопитающих⁷⁴.

6. Микроэкология и физиология уrogenитальных (УГТ) органов человека

Концентраций ЖК микробного происхождения в моче, эякуляте и вагинальном содержимом больных и здоровых людей измерена методом МСММ. Результаты статистического анализа их распределения свидетельствует о гомеостазе маркеров микроорганизмов в норме, следовательно, и соответствующего микробиоценоза локусов УГТ. Статистическая обработка данных позволила выявить два множества (кластера) значений концентраций минорных ЖК.^{80,81} Один из них с меньшим значением средних величин можно отнести к норме, а другой – с высоким средним уровнем – к патологии, т.е. воспалению.

а) Хронические вагиниты

В вагинальной жидкости имеется 19сус (циклононадекановая кислота), как компонент клеток аэробных бактерий рода *Lactobacillus* (палочки Додерлейна), которые являются нормальными обитателями вагины. 3-гидроксикислоты в жидкостях УГТ здоровых людей отсутствуют (менее 0,01 %) за исключением h16 и h18. В семенной жидкости обнаружены жирные альдегиды С 16 и С 18. Ряд веществ - гидроксикислоты h12, h14, h10, 2h14; циклопропановая кислота 17сус - не обнаруживаются у доноров.

Статистический анализ, проведенный по пакету программ Statistica, показал разделение множества значений концентраций большинства минорных жирных кислот (МЖК) на два кластера, что свидетельствует в пользу их микробного происхождения⁸⁰. Первый из них, более узкий, имеющий нормальное распределение, близок к уровню содержания соответствующих МЖК у доноров, по-видимому, соответствует норме. Второй кластер с широким, несимметричным распределением содержит множество значений, превышающих уровень содержания МЖК у доноров. Его следует отнести к патологическим отклонениям. Сопоставление данных анализа МЖК с клинической картиной заболевания подтверждает это предположение. Например, для пациентов с диагнозом гонорея характерно наличие 3-гидроксидедекановой кислоты (h12). При вагинитах или других воспалительных процессах наблюдается появление или увеличение по сравнению с нормой маркеров микроорганизмов, вызывающих инфекцию. Например, антеизо-кислоты - при стафилококковой аэробной инфекции; 3-гидроксидедекановая, 2-гидроксилауриновая - при псевдомонадной инфекции; изомиристиновая кислота, i14- при выявлении *Peptostreptococcus anaerobius*; гидроксидедекановая кислота - при инфекции видами *Bacteroides*. Увеличение концентрации 10-метилоктадекановой (туберкулостеариновой) кислоты обнаружено у больных туберкулезом, а увеличение в моче 3-гидроксиоктадекановой кислоты, специфичной для *Helicobacter pylori*, в большинстве случаев наблюдается у пациентов с гастритом или язвой желудка. Появление 3-гидрокси-изо-эйкозановой, 3-гидрокси-эйкозановой, 3-гидрокси-докозановой кислот, содержащихся в клетках *Chlamydia trachomatis*, характерно для пациентов с хламидиозом.

Многочисленные анализы инфекции и дисбиозов при вагинитах выявили ряд типичных случаев.

1. Гонококковый вагинит. В вагинальном секрете и соскобах присутствуют маркеры *Neisseria* и сопутствующей в таких случаях анаэробной микрофлоры (пептострептококк, бактероиды, фузобактерии, превотелла, *Selenomonas*). В то же время занижено содержание лактобацилл, бифидобактерий, некоторых клостридий, руминококков, актиномицетов, части эубактерий и других микроорганизмов нормофлоры - вагинальный дисбактериоз.
2. Синергизм актинобактерий и кокков. Превалируют аэробные актиномицеты (актинобактерии *Streptomyces*, *Nocardia* и др.) со стрептококками, бифидобактериями и руминококками. В числе кокков - *Rhodococcus equi*, который рассматривают как внутриклеточный условный патоген (аналог гонококка, но менее вирулентный - обычно

встречается у мужчин при простатите). Превышают норму некоторые другие бактерии, среди которых заслуживают внимания два вида клостридий.

3. Ложный кандидоз, подмена агента при молочнице. Похожую клинику дает *Clostridium perfringens* при отсутствии *Candida albicans*. Превышают норму маркеры анаэробных бактерий *C. perfringens* и *Propionibacterium spp.* Завышено содержание маркера *Staphylococcus epidermidis*.
4. Энтеробактерии. Эндотоксинемия. Ведущими микроорганизмами являются грамотрицательные микроорганизмы, преимущественно сем. *Enterobacteriaceae*, которые создают высокие концентрации эндотоксина в локусе и в крови.
5. Микоз, без участия кандиды. Существенно превышают норму маркеры микроскопических грибов, продуцирующих кампестерол и ситостерол, а также *Staphylococcus aureus* и клостридии *Clostridium propionicum* и *Clostridium perfringens*. Ниже нормы количество многих бактерий, в том числе бифидобактерий и лактобацилл (дисбактериоз).
6. Ведущая микрофлора представлена бактериями *Clostridium perfringens* и микроскопическими грибами *Candida albicans* при наличии *Streptococcus (Streptococcus oralis)* и грамотрицательных микроорганизмов родов *Klebsiella*, а также анаэробов *Eubacterium*.
7. У женщин с проблемами беременности или неудачами ЭКО методом ГХ-МС выявляется существенное превышение нормы «скрытыми» (от рутинных методов) компонентами нормальной микробиоты: *Clostridium perfringens*, *Helicobacter pylori*, *Streptomyces*, *Eubacterium*. При наличии такого рода токсигенных микроорганизмов в детородном органе как по отдельности, а тем более при одновременном присутствии, вряд ли будет возможным развитие оплодотворенной яйцеклетки в полноценный плод и нормальное протекание беременности⁸¹.

Полученные данные подтверждают современное представление об инфекциях УГТ как о полимикробном воспалении. Более того, данные показывают, что ни один из контролируемых таксонов микроорганизмов не сохраняет свою концентрацию в пределах нормы при воспалениях. Здесь понятие таксон может иметь ранг семейства или рода как правило. То есть, на самом деле видовое разнообразие микробиоценоза УГТ в несколько раз шире, в сравнении с результатами рутинных клинических обследований.. Следует отметить, что оно напоминает кишечную микробиоту своим качественным составом, в том числе анаэробами, среди которых фигурируют клостридии, бактероиды, бифидобактерии, лактобациллы, фузобактерии пептострептококки и эубактерии, обитающие в кишечнике. Такую связь отмечают авторы научных публикаций и практикующие врачи. Полученные нами данные еще раз свидетельствуют о том, что причину воспалений органов малого таза надо искать еще и в кишечнике.

Подобно микробиоте кишечника микробное сообщество слизистых половых органов женщин гомеостатично и играет положительную роль в обменных процессах и защите от внешних патогенов. В то же время оно проявляет и враждебные по отношению к хозяину функции, если состав микробиоты нарушен и токсинообразование, характерное для большинства представителей нормальной микробиоты, становится клинически значимым и может угрожать здоровью женщины. Более того, оно может угрожать и главной

физиологической функции женских половых органов – репродуктивной. протекание беременности.⁸¹

б). Воспалительные процессы внутренних половых органов женщин

По данным из научной литературы, воспалительные процессы внутренних половых органов составляют 62,5% в структуре гинекологической заболеваемости, причем, у 9,5% женщин диагностируют гнойные воспалительные заболевания маточных труб и яичников.

Отмечается, что инфекционные заболевания редко вызываются одним возбудителем. Смешанные инфекции составляют примерно 20-30% в структуре инфекционных заболеваний матки и придатков, т.е. почти у каждой третьей пациентки выявляется инфекционный процесс, вызванный несколькими возбудителями. Подавляющее большинство воспалительных заболеваний органов малого таза обусловлено собственной условно-патогенной микробиотой, ведущая роль в развитии которых принадлежит наиболее вирулентным анаэробам, энтеробактериям и коккам⁸². В микробиоте влагалища могут присутствовать гнилостные бактерии родов *Bacillus*, *Proteus*, *Clostridium*, *Spirochaeta*. Количество анаэробов преобладает над аэробами в 10 раз в микробиоценозе вагины⁸³. Выглядит перспективным выявление специфических веществ (маркеров микроорганизмов) и использование этих данных для реконструкции состава смешанной инфекции с помощью метода ГХ-МС. Этот метод применен для исследования инфекционной составляющей патологического процесса внутренних половых органов (цервикальный канал, матка, трубы, яичники), приводящего к необходимости оперативного решения проблемы. Исследованы 21 инфицированный биопат от 10 пациенток перенесших операции по разным поводам⁷⁹. Из 54 таксонов микроорганизмов, контролируемых в процессе анализа, 32 показывают избыточный рост (инфекцию). Инфицирование каждого исследованного материала включает несколько (до двенадцати) таксонов микроорганизмов. Это подтверждает тезис о смешанном характере инфекции половых органов женщин. Полученные данные подтверждают также сформировавшееся представление о доминировании анаэробов. Их доля составляет 70-90% по нашим измерениям и соответствует оценке других авторов. В отличие от предыдущих работ измерения методом МСММ носят количественный характер, что позволяет выявить микробные доминанты воспалительного процесса на одной и той же пробе инфицированного материала в разных отделах организма, а также сопоставлять результаты измерений разных пациентов. Оказалось, что доминантами у 11 больных из 12 обследованных являются кишечные бактерии вида *Propionibacterium freudenreichii*, родов *Eubacterium*, *Clostridium* и *Bifidobacterium*. Такой тип инфекции показан на рис 22, где в графическом выражении лучше иллюстрируется количественные изменения относительно нормы и других составляющих микробного сообщества.

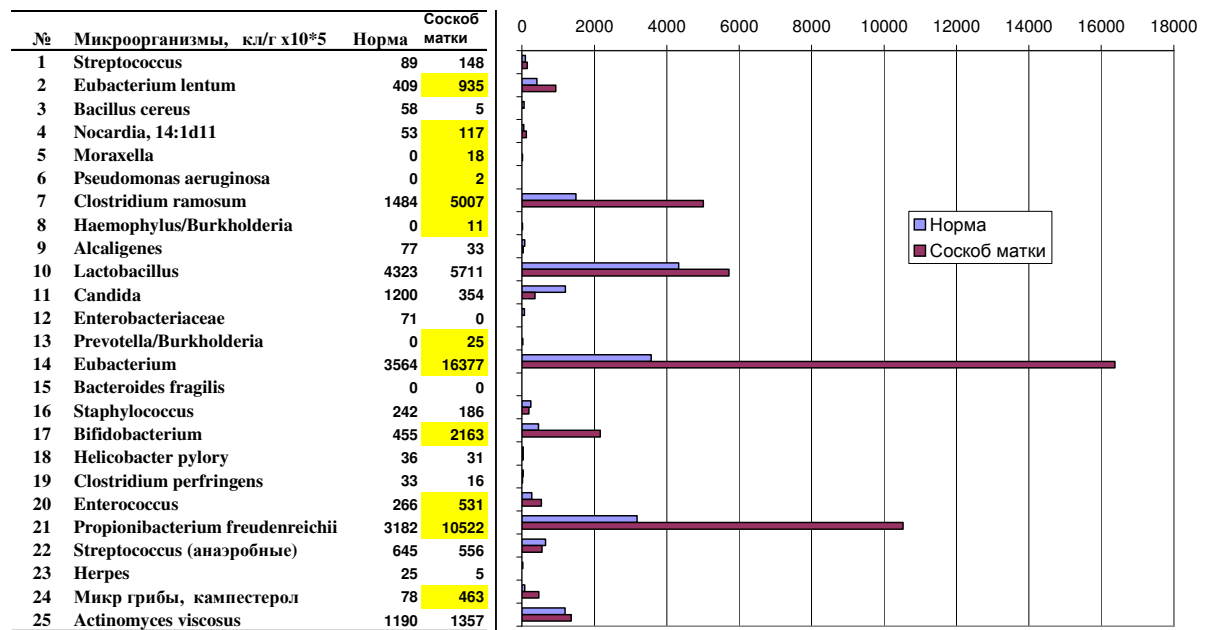


Рис. 22. Избыточный рост микроорганизмов (инфекция) полости матки. Доминируют маркеры кишечных микроорганизмов: клостридий группы *C. ramosum*, основной группы эубактерий (*E. moniliforme*, *E. nodatum*, *E. sabureum*), пропионобактерий (*Propionibacterium freudenreichii*). Клинически значимый уровень превышают маркеры превотелл, нокардий, энтерококков.

Серия анализов одной и той же больной показывает более чем десятикратное увеличение численности вида *P. freudenreichii*, родов *Eubacterium* и *Bifidobacterium* в матке и придатках по сравнению с уровнем колонизации влагалища в норме. В трубах и ткани яичников уровень колонизации бифидобактериями, эубактериями и пропионобактериями достигает $3-6 \times 10^9$ клеток/мл. При этом в эндометрии и ткани матки избыточного роста этих бактерий не наблюдается. В этом можно усматривать специфику инфицирования верхних половых органов, так как при вагинитах в слизистой влагалища их рост хотя и происходит, но не в такой степени. Для вагины более характерна инфекция *Clostridium perfringens*. При воспалениях, напоминающих по клиническим проявлениям кандидоз, их численность до 30 крат превышают уровень колонизации слизистой оболочки в норме. В исследованных пробах верхних отделов клинически значимых превышений маркера *C. perfringens* (10-гидроксистерариновая кислота) не обнаружено. Здесь регулярно участвует в воспалительном процессе другая группа клостридий – *C. ramosum*. Их численность до семи раз превышает норму в исследованных материалах. Из трудно культивируемых микроорганизмов, которые позволяет выявить масс-спектрометрический метод, следует отметить еще анаэробы *Actinomyces viscosus*, численность которых в ряде проб до пяти раз выше нормальной. В отдельных случаях в состав микст-инфекции включены аэробные (оральные) и анаэробные стрептококки *S. mutans*.

Выявляемые в клинических лабораториях при рутинных анализах микроорганизмы в рейтинговом положении оказываются во втором ранге смешанной инфекции верхних половых органов. Максимального уровня в этой группе достигает энтерококк – 10^8 клеток/мл. Тогда как

перечисленные выше доминирующие анаэробы занимают порядки 10^8 - 10^{11} . Грамотрицательные микроорганизмы *Moraxella/Acinetobacter*, *P. aeruginosa*, *Haemophilus/Burkholderia*, *Prevotella*, *B. fragilis*, *H. pylori* обнаруживаются в исследованных пробах в количестве 10^5 - 10^7 клеток/мл. Представители сем. *Enterobacteriaceae* присутствуют, но не выходят за пределы уровня колонизации вагины в норме.

Результаты этого анализа перспективны для выявления и консервативного лечения подобного рода заболеваний на ранних стадиях, а также уточнения механизма возникновения патологических изменений матки и придатков, приводящих к необходимости оперативного вмешательства. Обнаружение в послеоперационном материале огромного количества слизиобразующих кишечных микробов, равно как при муковисцидозе, простатите и пиелонефрите, дает основание предположить, что они могут вызывать нарушение нормальных физиологических процессов в органах не только за счет своих факторов патогенности (инвазия, эрозия, токсигенность и прочее), а также за счет физического перекрытия мембран и капилляров мукозной биомассой.

VII. Заключение

Приведенные здесь примеры в целом показывают, что диагностика возбудителей инфекционных процессов по данным масс-фрагментографии биологических жидкостей является экспрессным, чувствительным и универсальным методом индикации, одинаково эффективным как для аэробных, так и для анаэробных микроорганизмов.

Он может быть использован для определения любого микроба, имеющего в составе структурных клеточных компонентом вещество-маркер, отличное от химических веществ фоновой биологической жидкости. Наши наблюдения и литературные данные свидетельствуют о достаточном количестве клеточных компонентов, специфичных сугубо для возбудителя, по которым его можно идентифицировать, используя индивидуальные или коллективные маркеры⁸⁴.

Чувствительность метода составляет 10^4 - 10^5 клеток в пробе в зависимости от содержания маркера в клетке. В этом качестве метод уступает микробиологическому методу селективных сред, однако имеет преимущества в экспрессности.

В настоящее время для проведения анализа требуется примерно менее 3 часов на 1 образец, или 7 часов на серию из 5 проб, тогда как бактериоскопия занимает, как минимум, сутки. Экспрессность и универсальность анализа при возможности точного определения численности микроорганизмов позволили за короткий срок пополнить сведения о микробной этиологии многих заболеваний сердца и сосудов⁸⁵, респираторных органов, кишечника, кожи^{86,87}, мочеполовой сферы, печени, послеоперационных и травматических инфекций и

дисбиозов. Полученные одновременно для каждого больного воспроизводимые данные по составу микроорганизмов, участников инфекционного процесса при оценке общего микрoэкологического статуса, позволили врачу получить качественно новую обширную информацию для принятия адекватной антимикробной и общей терапии. В подтверждение достоверности результатов обследования методом МСММ следует отметить, что они соответствуют существующим прогрессивным представлениям об инфекции и дисбиозах. В том отношении, что инфекции в подавляющем большинстве случаев полимикробны, в них доминируют анаэробы, в воспалениях существенную роль в провоспалительных и противовоспалительных актах играет собственная автохтонная микробиота организма человека.

Литература

1. Persing D.H. Polymerase chain reaction: trenches to benches.// *J. Clin. Microbiol.*, 1991, Vol. 29, № 7, p. 1281-1285.
2. 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.
3. 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.
4. Осипов Г.А. Способ определения родового (видового) состава ассоциации микроорганизмов./Патент РФ № 2086642. С12N 1/00, 1/20, С12Q 1 /4, 24.12.1993.
5. Осипов Г.А., Белобородова Н.В. Способ выявления возбудителя инфекционного процесса в стерильных биологических средах макроорганизма./ Патент РФ № 2146368, РФ 10.03 2000.
6. 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, 15.10.1994, Бюл.№19.
7. Luckey T.D. Overview of gastrointestinal microecology.// *Nahrung*, 1987, Vol. 31, № 5-6, p. 359-364.
8. Suau A., Bonnet R., Sutren M., Godon J.J., Gibson G.R., Collins M.D., Doré J. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut.// *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, Vol. 65, № 11 p. 4799 – 4807.
9. Stead, D.E., Sellwood, J.E., Wilson, J., et al. 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.
10. Вейант Р., Мосс У., Холлис Д., Джордан Дж., Кук Э., Дейншвар М. Определитель нетривиальных патогенных грамотрицательных бактерий. М. Мир, 1999, с. 612-783
11. White D.C. Validation of quantitative analysis for microbial biomass, community structure, and metabolic activity.// *Adv. Limnol.*, 1988, №31, p. 1-18.
12. Осипов Г.А. Демина А.М. Хромато-масс-спектрометрическое обнаружение микроорганизмов в анаэробных инфекционных процессах.// *Вестник РАМН*, 1996, Т.13, №2, с. 52-59.

13. Турова Е.С., Осипов Г.А. Изучение структуры микробного сообщества, активного в биотрансформации минералов железа в каолине.// Микробиология, 1996, Т. 65, № 5, с. 682-689.
14. Chemical Methods in Bacterial Systematics.// Eds M. Goodfellow. D.E. Minnikin.- New York; London.-1985.
15. Васюренко З.П., Фролов А.Ф., Смирнов В.В., Рубан Н.М. // Жирнокислотные профили бактерий, патогенных для человека и животных.// Киев. Наукова думка. -1992.
16. Осипов Г.А. // Хромато-масс-спектрометрическое исследование микроорганизмов и их сообществ. Диссертация доктора биологических наук.// Москва. -1995.
17. Moss C.W., Dees S.R.// Identification of microorganisms by gas chromatographic - mass spectrometric analysis of cellular fatty acids.//J.Chromatography.-1985.-Vol.12.-P.595-604.
18. Jantzen E., Bryn K. Whole-cell and lipopolysaccharide fatty acids and sugars of gram-negative bacteria. in: Chem. methods in bacterial systematics.- 1985.- Acad. Press.- p.145-172.
19. Sonesson A., Larsson L., Westerdahl G., Odham G. Determination of endotoxins by gas chromatography: evaluation of electron-capture and negative-ion chemical ionization mass spectrometric detection of halogenated derivatives of β -hydroxymyristic acid. J.Chrom.,Biomed.Appl.- 1987.-Vol.417.-P.11-25.
20. Andreev L.V., Akimov V.N., Nikitin D.I. Peculiarities of fatty acid composition of the genus *Caulobacter*. Folia Microbiol.31, 144-153(1986).
21. Dennemont J., Roupas A., Heitz M. Differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C.coli*, *C.lary* and *C.fetus* fatty acid profiles obtained by gas chromatography - mass spectrometry and by their hippurate hydrolysis. // Mitt. Geb.Lebensmittelunters.Hyg.- 1992.-Vol.83.-N2.-P.142-150.
22. Morgan S.L., Fox A., Gilbert J. Profiling, structural characterization, and trace detection of chemical markers for microorganisms by gas chromatography - mass spectrometry. J.Microbiol.Methods.- 1989.Vol.9.-P.57-69.
23. Larsson L. // Determination of microbial chemical markers by gas chromatography-mass-spectrometry – potential for diagnosis and studies on metabolism in situ. Review article.// - APMIS.-1994.-Mar. 102:3.-161-9
24. Hui M, Cheung SW, Chin ML, Chu KC, Chan RC, Cheng AF. Development and application of a rapid diagnostic method for invasive Candidiasis by the detection of D-/L-arabinitol using gas chromatography/mass spectrometry. Diagn Microbiol Infect Dis. 2004 Jun;49(2):117-23
25. Maitza S.K., Schotz M.C., Yoshikawa T.T., Guze L.B.// Determination of lipid A and endotoxin in serum by mass-spectroscopy.// Proc.Natl.Acad.Sci.USA.-1978.-V.75.-P.3993.
26. Brandtzaeg, P., Bryn, K., Kierulf, P., et al. 1992. Meningococcal endotoxin in lethal septic shock plasma studied by gas chromatography, mass-spectrometry, ultracentrifugation and electron microscopy. J.Clin.Investig. 89, 816-823.
27. Sud I.J., Feingold D.S. Detection of 3-hydroxy fatty acids of picogram levels in biologic specimens. A chemical method for the detection of *Neisseria gonorrhoeae*? The Journal of Investigative Dermatology. 1979,v.73,p521-526
28. Bronds J., Olsen J. Chemotaxonomy at a crossroads? Gas chromatographic analysis of a single colony from the bacterium *Haemophilus aphrophilus*. J.Chrom.,Biomed.Appl. -1986.-Vol.374.-N1.-P.119-124.
29. Larsson L., Saraf A., Axelsson B.-O. Determination of ergosterol in organic dust by gas chromatography-mass spectrometry. -1995. -666. -77-84.
30. Larsson L., Saraf A. Use of gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry for the detection and characterization of microorganisms in complex samples. -Mol. Biotechnol.-1997.-Jun.7:3.-279-87.
31. R Ferrando, B Szponar, A Sanchez, L Larsson, and PL Valero-Guillen. 3-Hydroxy fatty acids in saliva as diagnostic markers in chronic periodontitis. J Microbiol Methods, September 1, 2005; 62(3): 285-91.

32. Brondz J., Olsen J. Microbial chemotaxonomy. Chromatography, electrophoresis and relevant profiling techniques. J. Chrom., Biomed. Appl. -1986.-Vol. 379.-P. 367-411
33. Chemical methods in Procariotic Systematics (1994) (Goodfellow, M. and O'Donnell, A.G., Eds.), John Willey and Sons, Chiduster, UK
34. Nichols P.D., Mancuso C.A., White D.C. Measurement of methanotroph and methanogen signature phospholipids for use in assessment of biomass and community structure in model system. Org.Geochem.-1987.-Vol.11.-No.6.-P.451-462.
35. Shekhovtsova N.V., Osipov G.A., Verkhovtseva N.V., Pevzner L.A. Analysis of lipid biomarkers in rocks of the Archean crystalline basement. Proceedings of SPIE.- 2003.- Vol.4939.- P. 160 – 168
36. N.V. Verkhovtseva, G.A. Osipov, T.N. Bolysheva, V.A. Kasatikov, N.V. Kuzmina, Ju.Antsiferova and A.S. Alexeeva. **Comparative Investigation of Vermicompost Microbial Communities;** In: “Microbiology of Composting”/ Ed. H.Insam, Springer-Verlag,GmbH&Co.KG, 2002,pp.91-111. Berli, Heidelberg, New York
37. Н.В. Верховцева, Е.Б Пашкевич ,Г.А. Осипов ,Н.А Флесс , В.Г. Минеев. Изменение состава микробного сообщества дерново-подзолистой супесчаной почвы при внесении сидератов и соломы в качестве органических удобрений. Доклады РАСХН, 2002, №5, с.25-28
38. Верховцева Н.В., Ларина Г.Е., Спиридонов Ю.Я., Степанов А.Л., Осипов Г.А. Микробные консорциумы почв агроценозов разных природных зон России с учетом их сельскохозяйственного использования. Проблемы агрохимии и экологии. 2008, № 2, С. 37-43.
39. Ручкина И.Н. Диссертация доктора медицинских наук. Москва. -2006.
40. Полеско И.В. Диссертация доктора медицинских наук. Москва. -2009.
41. О'Лири. Липиды микроорганизмов: В кн. Молекулярная микробиология, М.. Мир, 1977, с. 201-239
42. McNabb A., Shuttleworth R., Behme R. et al. Fatty acid characterization of rapidly growing pathogenic aerobic actinomycetes as a means of identification. J.Clin.Microbiol. 1997, v.35, N.6, p.1361-1368.
43. Kaneda T. Fatty acids in the genus bacillus: an example of branched chain preferences. Bacteriol.Rev. 1977, 41:391-418
44. Kaneda T. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function and taxonomic significans. Microbiol.Rev.-1991.-Vol.55.-N2.-P.288-302.
45. 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
46. Manual of Clinical Microbiology. 5-th ed. Editor in Chief - Albert Balows. Washington, 1991, pp. 317-318.
47. “Sherlock”, Microbial identification system. Database on microbial cellular fatty acids. MIDI Inc. Delavare, 1994.
48. Nichols P.D., Leeming R., Rayner M.S., et al. (1996). Use of capillary gas chromatography for measuring fecal-derived sterols. J.Chrom.,A 733, 497-509.
49. Mosca A., Summanen P., Finegold S M., De Michele G, and Miragliotta G. Cellular Fatty Acid Composition, Soluble-Protein Profile, and Antimicrobial Resistance Pattern of *Eubacterium lentum*. J. Clin.Microbiol., Mar. 1998, p. 752–755 Vol. 36, No. 3
50. Moss C.W., Lambert M.A. Lombard G.L. Cellular fatty acids of *Peptococcus variabilis* and *Peptostreptococcus anaerobius*.. J. Clin.Microbiol. 1977, 5(6), 665-7.
51. Zhilina, T. N., Kotsyurbenko, O. R., Osipov, G. A., Kostrinka, N. A.& Zavarzin, G. A. (1995). *Ruminococcus palustris* sp. nov. - a psychoactive anaerobic organism from a swamp. *Microbiology* (English translation of *Mikrobiologiya*) 64, 674-680
52. Takatori T, Ishiguro N, Tarao H, Matsumiya H. Microbial production of hydroxy and oxo fatty acids by several microorganisms as a model of adipocere formation. Forensic Sci Int 1986 Aug-Sep;32(1):5-11

53. Allen S.D., Siders J.A., Riddell M.J., et al. Cellular fatty acid analysis in the differentiation of *Clostridium* in the clinical microbiology laboratory. Clin.Infect.Dis. 1995 Jun;20 Suppl 2:S198-201.
54. Miyagawa E., Azuma R., Suto T. Cellular fatty acid composition in gram-negative obligately anaerobic rods. J.Gen.Appl.Microbiol.-1979.-Vol.25.-P.41-51.
55. Mayberry W.R., Lambe D.W., Jr.; Ferguson H.P. Identification of *Bacteroides species* by cellular fatty acid profiles. Int.J.Syst.Bacteriol.-1982.-Vol.32(1).-p.21
56. Brondz I., Olsen I. (1991) Multivariate analyses of cellular fatty acids in *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Wolinella* and *Campylobacter spp.* J.Clin.Microb., V 29 (1) :183-89.
57. Tsuchiya H., Masaru S., Kato M. et al., High-Performance Liquid Chromatographic analysis of bacterial fatty acid composition for chemotaxonomic characterization of oral streptococci.// J. Clin.Microbiol., 1986, 24(1), 81-85.
58. Vuorio, R, MA Andersson, FA Rainey, RM Kroppenstedt, P Kampfer, HJ Busse, M Viljanen, and M Salkinoja-Salonen A new rapidly growing mycobacterial species, *Mycobacterium murale sp. nov.*, isolated from the indoor walls of a children's day care centre Int. J. Syst. Bacteriol., Jan 1999; 49: 25.
59. Axelsson B.-O., Saraf A., Larsson L. Determination of ergosterol in organic dust by gas chromatography - mass spectrometry. // J. Chromatogr.B, 666 (1995) 77-84.
60. Howell SA, MK Moore, AI Mallet, and WC Noble. Sterols of fungi responsible for superficial skin and nail infection.J Gen Microbiol, Feb 1990; 136(2): 241-7.
61. J.S.Sadler et al. J.Gen/Microbiol 1987,133,1137-1147
62. Geis G., Leying H., Suerbaum S., Opferkuch W. Unusual fatty acid substitution in lipids and lipopolysaccharides of *Helicobacter pylori*. J.Clin.Microbiol. 1990, 28(5): 930-932
63. Birek C., Grandhi R., McNeil K. et al. Detection of *Helicobacter pylori* in oral aphthous ulcers. J.Oral.Pathol.Med. 1999, 28(5): 197-203
64. Farsak, Bora ; Aylin Yildirim, Yakut Akycn et al. Detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacter pylori* DNA in Human Atherosclerotic Plaques by PCR. - J.Clin.Microbiol. 2000 V.38,№ 12: 4408-4411.
65. Jantzen E., Berdal B.P., Omland T. Fatty acid taxonomy of *Haemophilus species*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus vaginalis* (*Corinebacterium vaginae*). Acta Path.Microbiol.Scand. 1991, 88B: 89-93
66. Stoakes L., John M.A., Lannigan R. et al. Gas-liquid chromatography of cellular fatty acids for identification of staphylococci. Clin.Microbiol. 1994 Aug.; 32(8): 1908-10
67. Bernard K.A, Bellefeuille M., Ewan E.P. Cellular fatty acid composition as an adjunct to the identification of asporooogenous, aerobic gram-positive rods. J.Clin.Microbiol. 1991, 29(1): 83-89.
68. Nurminen M. Chemical characterization of *Chlamydia trachomatis* LPS. - Infection and Immunity. 1985, 48(2): 573-75
69. Schaechter M., Medoff G.,Eisenstein B.J. (Eds). Mechanisms of Microbial Disease. Williams & Wilkins. 1993. P. 699.
70. Hopkins M.J., R. Sharp, G.T. Macfarlane, 2001. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. Gut; 48;198-205.
71. 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. Т. 4, С. 59-67
72. Osipov G.A., Boiko N.B., Verkhovtseva N.V. et al. Preliminary differentiation of bacteria in clinical and environmental samples by fatty acid features and profiles. 4-th Int.Symp. on the Interface between Analytical Chemistry and Microbiology, June 4-7, 2000, Tregastel - Bretagne, France. Thesis
73. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.// Baltimore,London.- Wilians&Wilkins.- 1984.

74. 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.
75. 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.
76. 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.
77. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Издание в 3-х томах, Т1. -М., Грант, 1998
78. Ionescu G, Kiehl R, Ona L, Schuler R. Abnormal fecal microflora and malabsorption phenomena in atopic eczema patients. *J Adv Med* 1990; 3:71-89.
79. 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 стр. 20-23.
80. 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. Иммунол.* 2003, № 2: 92-101
81. Осипов Г.А., Крымцева Т.А., Осипов Д.Г., Столярова О.Н. Функциональные изменения жирнокислотного состава урогенитальных жидкостей организма человека при дисбиозах. *Прометей.* Москва, 2005
82. Сидорова И.С. , Макаров И.О., Шешукова Н. А. Воспалительные заболевания внутренних половых органов. *Практическая медицина.* Москва, 2007.
83. Wilkins M., Thin R. N., Tabaqchall S. Quantitative bacteriology of the vaginal flora in genital disease // *J. Med. Microbiol.* 1984, 18:2, 217-231.
84. 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, 20: 437-446.
85. Хабиб О.Н. Белобородова Н.В. Осипов Г.А. Детектирование молекулярных маркеров бактерий в ткани клапанов сердца в норме и при патологии с применением метода газовой хроматографии и масс-спектрометрии *Журн. Микроб. Эпидем. Иммунол.*, 2004, Том 7, № 3: 62-68
86. Полеско И.В., Бутов Ю.С., Осипов Г.А., Малиновская В.В. Спектрометрическое исследование состава микроорганизмов кишечника у больных себорейным дерматитом. *Рос. журн. кож. и вен. бол.* -2006, № 3, с.23-27
87. 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