

Зарегистрировано в Росздравнадзоре за № НЮ-40006 от 17.08.2009г

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РФ
ИНСТИТУТ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ РАН

**ОЦЕНКА МИКРОЭКОЛОГИЧЕСКОГО
СТАТУСА ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ
ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

Новая медицинская технология

МОСКВА
2008

Аннотация. Предлагаемая медицинская технология может быть использована для диагностики микроорганизмов, возбудителей инфекций, а также для количественного анализа родового или видового состава микробных сообществ, формирующихся в тканях и органах человека. 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 небιологических 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.

Данная технология предназначена для врачей-микробиологов и может быть использована в микробиологических лабораториях клиник.

Организация-заявитель: ГНЦ РФ ИМБП РАН, г. Москва.

Авторы медицинской технологии: академик РАМН Баранов В.М., д.б.н. Осипов Г.А., д.м.н. Мухамедиева Л.Н., д.м.н. проф. Белобородова Н.В., Пахомова А.А., д.м.н. Ильин В.К. и к.б.н. Родионова Т.А.

Авторские права защищены следующими патентами:

Осипов Г.А. Способ определения родового (видового) состава ассоциации микроорганизмов./Патент РФ № 2086642. С12N 1/00, 1/20, С12Q 1 /4, 24.12.1993.

Осипов Г.А., Белобородова Н.В. Способ выявления возбудителя инфекционного процесса в стерильных биологических средах макроорганизма./ Патент РФ № 2146368, РФ 10.03 2000.

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.

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр
1. Введение	4
2. Показания к применению технологии	5
3. Противопоказания к применению технологии	6
4. Материально-техническое обеспечение технологии	7
4.1. Отбор проб, их хранение и транспортировка	7
4.2. Средства измерения, стандартные образцы и реактивы	7
5. Описание медицинской технологии	8
5.1. Подготовка пробы к ГХ-МС анализу	13
5.1.1. Общая схема пробоподготовки	13
5.1.2. Рекомендации по обработке различных клинических проб	14
5.1.2.1. Кровь, слюна, ликвор	14
5.1.2.2. Моча	14
5.1.2.3. Мокрота, гнойный экссудат, вагинальный секрет, эякуляты	15
5.1.2.4. Биоптаты тканей	15
5.1.2.5. Мазок с поверхности кожи	15
5.2. Сканирование пробы	15
5.3. Сбор данных и первичный протокол площадей аналитических пиков	18
5.4. Интерпретация результатов и выявление таксономически значимых жирных кислот	23
6. Возможные осложнения при использовании медицинской технологии и способы их устранения	30
7. Эффективность использования медицинской технологии	31
8. Список литературы	37

1. ВВЕДЕНИЕ

Применяемые на сегодняшний день в клинической практике методы определения микрoэкологического статуса, 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 иммуносерологический 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 (Persing, 1991; Fenollar et al., 2006; Михайлова и др., 2008).

Из всего вышесказанного вытекает очевидная востребованность в надежном количественном экспресс-методе диагностики дисбактериозов и определения возбудителей инфекции.

По нашему мнению, таким методом может стать хемодифференциация микроорганизмов с помощью ГХ-МС, основанная на количественном определении маркерных веществ микроорганизмов (жирных кислот, альдегидов, спиртов и стероидов). Предлагаемая технология позволяет не только проводить мониторинг этих соединений в образцах, но также и рассчитывать численность микроорганизмов того или иного таксона в образце. 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, присутствующих, например, в фекалиях (Luckey, 1987; Suaud et al., 1999).

Предлагаемый метод газовой хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрией, (ГХ-МС) позволяет детектировать в исследуемых образцах маркеры, компоненты клеток широкого спектра микроорганизмов нормальной и патогенной микробиоты человека. Метод является высокочувствительным, быстрым (3 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. Предлагаемый метод ГХ-МС обеспечивает возможность детектировать одновременно множество маркеров микроорганизмов при проведении анализа одного образца. 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 стерины) в чистых культурах микроорганизмов, выделенных из клинического материала (Вейант и др., 1999), но и выявлять и количественно определять состав микробного сообщества, который кроется за набором маркеров конкретной пробы (White, 1988; Осипов, Демина, 1996).

2. ПОКАЗАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ТЕХНОЛОГИИ

Показанием к применению технологии определения количественного состава микробных сообществ методом ГХ-МС является:

- 1) Определение микрoэкологического статуса организма и его отклонений от гомеостаза;
- 2) Выявление или уточнение этиологии инфекционно-воспалительного процесса при любых нозологических формах заболеваний в клинической практике;

Эффективное использование метода в клинической диагностике возможно в следующих отделениях и для следующих групп больных:

Отделения реанимации и интенсивной терапии	Сепсис, гнойно-воспалительные очаги, лихорадка неясной этиологии, менингит, бактериурия, полиорганная недостаточность
Хирургические отделения	Инфекция вследствие хирургического вмешательства, гнойно-воспалительная инфекция, абсцессы почек и печени, воспалительные процессы респираторных органов, воспаление внутренних половых органов, ожоговая инфекция, гангрена, перитонит, синовит
Гинекологические отделения	Хронический вагинит, цистит, воспаление матки и придатков, кандидоз истинный и ложный
Урология и андрология	Пиелонефрит, буллезный цистит, уретрит, простатит, орхит, гонорея
Отделения репродукции и планирования семьи	Мужское и женское бесплодие, связанное с инфекциями половых органов
Отделение гастроэнтерологии	Синдром раздраженного кишечника, гастрит, дисбактериоз пристеночной кишечной микробиоты, диарея, запор, болезнь Крона
Пульмонология	Муковисцидоз, пневмония, туберкулез, плеврит, лихорадка неясного генеза
ЛОР отделения	Гайморит, синусит, фарингит, отит
Кардиологические отделения	Эндокардит, врожденный порок сердца, инфекция в области хирургического вмешательства
Иммунология и генетика	Муковисцидоз, средиземноморская семейная лихорадка, СПИД (инфекционные последствия - вторичная инфекция), атипическая пневмония
Гепатология	Асцит, дисбактериоз, спонтанный бактериальный перитонит
Дерматовенерология	Угревая болезнь, атопическая экзема, себорея, онихомикоз, псориаз, дерматиты неясной этиологии, сифилис

3. ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ ТЕХНОЛОГИИ

Противопоказаний к применению метода ГХ-МС нет.

4. МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ

4.1. Материалы исследования, отбор проб, их хранение и транспортировка

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.

Образцы биологической жидкости или ткани обрабатывают сразу или замораживают и хранят при $-5/-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $70-85\text{ }^{\circ}\text{C}$).

4.2. Средства измерений, стандартные образцы и реактивы

Для разработки метода использовались следующее оборудование и реактивы

Оборудование	Фирма	Страна	№ в Госреестре
Хромато-масс-спектрометр АТ 5973 (газовый хроматограф с масс-селективным детектором серийного выпуска)	Agilent Technologies Inc.	США	Рег.удостоверение МЗ РФ №2001/978
Термостат TDB-120	Biosan	Латвия	Рег.удостоверение ФС №2005/519
Система интенсивного встряхивания Vortex V-1 plus,	Biosan	Латвия	Сертификат соответствия № РОСС LV.АЯ46.В67098
Дозаторы пипеточные Ленпипет Дигитал переменного объема (2-20; 10-100 и 100-1000 мкл)	ЗАО Термо Фишер Сай-ентифик	РФ	Рег.удостоверение № ФСР 2007/01432
Дозаторы пипеточные переменного объема Ленпипет Колор (20-200 мкл)	ЗАО Термо Фишер Сай-ентифик	РФ	Рег.удостоверение № ФСР 2007/01433

Технология отработана на хромато-масс-спектрометрах АТ 5973 D фирмы Agilent Technologies, США, и аналогичных приборах фирм Shimadzu (Япония) и Micromass (Великобритания) состоящих из собственно масс-спектрометра, со-

единенного 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, имеет 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 HP-5 ms.

Для обсчета данных на персональном компьютере разработан алгоритм (Осипов Г.А. Способ определения родового (видового) состава ассоциации микроорганизмов./Патент РФ № 2086642. С12N 1/00, 1/20, С12Q 1 /4, 24.12.1993.), который можно использовать на РС класса не ниже Pentium 1. Для установки и оперирования программ обработки данных ГХ-МС анализа классов С и D (т.е., на новейших моделях прибора - 1998 г. и далее) необходимо наличие операционной системы Windows 2000, ХТ или NT.

Указанные средства измерений и реактивы могут быть заменены аналогичными, метрологические характеристики которых не хуже приведенных.

Эксплуатацию хромато-масс-спектрометра осуществляют в соответствии с прилагаемыми к прибору техническим описанием и инструкцией.

5. ОПИСАНИЕ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ

Газовая хроматография в сочетании с масс-спектрометрией (ГХ-МС) позволяют получить уникальную информацию о составе особых мономерных химических компонентов микробной клетки, характерных для тех или иных таксонов (Bergey's Manual of Systematic Bact., 1984; Stead et al., 1992; Вейант, 1999) Эти компоненты (маркеры) могут быть определены среди других химических составляющих суммарной биомассы биологических объектов и использованы для детектирования микроорганизмов соответствующего рода или вида (White, 1988; Турова, Осипов, 1996; Osipov, Turova 1997)

Суть анализа состоит в прямом извлечении с помощью химической процедуры высших жирных кислот из подлежащего исследованию образца, их разделения на хроматографе в капиллярной колонке высокого разрешения и анализа состава в динамическом режиме на масс-спектрометре. Поскольку хроматограф соединен в едином приборе с масс-спектрометром и снабжен компьютером с соответствующими программами автоматического анализа и обработки данных, сам процесс анализа занимает 30 мин, а с учетом времени пробоподготовки и расчета данных - не более 3 часов. Его результатом является количественное определение состава микроорганизмов.

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

Таблица 1. Высшие жирные кислоты альдегиды и стерины в составе клеточной стенки с отнесением к микроорганизмам, у которых они наиболее часто встречаются (вещества приведены в порядке возрастания числа атомов углерода в цепи молекулы, что соответствует хроматографическому времени удерживания)

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

19.	15:0	Пентадекановая.	Большинство видов микроорганизмов, минорный компонент, pp. <i>Selenomonas</i> , вв. <i>Clostridium sporogenes</i> , <i>Bacteroides succinogenes</i> , <i>Bact. ruminicola</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i>
20.	i16:1	Изогексадеценная	p. <i>Desulfovibrio</i>
21.	16:1Δ7	7,8-гексадеценная	в. <i>Clostridium ramosum</i>
22.	16:1Δ9	9,10-гексадеценная	Большинство видов микроорганизмов
23.	16:1Δ11	11,12-гексадеценная	p. <i>Ruminococcus</i>
24.	i16:0	Изопальмитиновая	pp. <i>Streptomyces</i> , <i>Nocardiosis</i> ,
25.	10Me16	10-метилгексадекановая	p. <i>Rhodococcus</i>
26.	16:0	Пальмитиновая	Большинство видов микроорганизмов
27.	i17:1	Изопентадеценная	в. <i>Campylobacter mucosales</i>
28.	17:1	Гептадеценная	p. <i>Mycobacterium</i> , в. <i>Candida albicans</i>
29.	i17:0	Изогептадекановая	pp. <i>Bacillus</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Prevotella</i>
30.	a17:0	Антеизогептадекановая	pp. <i>Corynebacterium</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Nocardiosis</i> , <i>Nocardia</i>
31.	17сус	Циклогептадекановая	сем. <i>Enterobacteriaceae</i>
32.	17:0	Гептадекановая	Большинство видов микроорганизмов, минорный компонент
33.	18:4	Октадекатетраенная	Некоторые грибы и дрожжи
34.	18:3	Ланоленовая	Грибы и дрожжи
35.	18:2	Линолевая	Грибы, дрожжи, простейшие
36.	18:1Δ9	Олеиновая	Все организмы
37.	i18:1 H		в. <i>Enterococcus faecalis</i>
38.	18:1Δ11	Цис-вакценная	pp. <i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , в. <i>Cardiobacterium hominis</i>
39.	18:0	Стеариновая	Многие микроорганизмы
40.	i18	Изооктадекановая	pp. <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Nocardiosis</i> , вв. <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Clostridium difficile</i>
41.	10Me18	10-метил-октадекановая, (туберкулостеариновая)	pp. <i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i> ; вв. <i>Corynebacterium bovis</i> , С. гр. <i>xerosis</i> , <i>C. urealyticum</i> ,
42.	11Me18:1	11-метилоктадеценная	p. <i>Aflipia</i> , в. <i>Helicobacter mustelae</i>
43.	19сус	Циклононадекановая	pp. <i>Lactobacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Bruccella</i> , <i>Campylobacter</i> , сем. <i>Enterobacteriaceae</i> , в. <i>Helicobacter pylori</i>
44.	i19	Изононадекановая	вв. <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacteroides hypermegas</i>
45.	a19	Антеизононадекановая	p. <i>Staphylococcus</i>
46.	19:0	Нонадекановая	pp. <i>Nitrobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Serratia</i> ; в. <i>Burkholderia cepacia</i>
47.	i19:1	Изо-нонадеценная	p. <i>Aflipia</i>
48.	20:1	Эйкозеновая	вв. <i>Propionibacterium jensenii</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>St. salivarius</i> , <i>St. mutans</i> , p. <i>Actinomyces</i>
49.	20:0	Эйкозановая	p. <i>Actinomyces</i>
50.	20:1Δ11	11-эйкозеновая	в. <i>Streptococcus mutans</i>
51.	21:0	Бегеновая	p. <i>Francisella</i>
52.	22:6	Докозагексенная	грибы, эукариоты
53.	22:0	Докозановая	p. <i>Francisella</i>
54.	C22:4	Арахидоновая кислота	Простейшие и высшие организмы
55.	24:0	Тетракозановая	p. <i>Francisella</i> , <i>Mycobacterium</i> , микроэукариоты

56.	25:0	Пентакозановая	Микроэукариоты
57.	26:0	Гексакозановая	р. <i>Mycobacterium</i> , микроэукариоты
Гидроксикислоты			
58.	3h10	3-гидроксидекановая	<i>Bordetella pertussis</i> , <i>B. parapertussis</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> , <i>Ps. alcaligenes</i> , <i>Ps. stutzeri</i> , <i>Ps. mendocina</i> , р. <i>Comamonas</i>
59.	2h10	2-гидроксидекановая	р. <i>Pseudomonas</i>
60.	3hi11	3-гидроксиизоундекановая	в. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ,
61.	2hi11	2-гидроксиизоундекановая	в. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ,
62.	3h12:1	гидроксидодеценная	в. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
63.	3h12	3-гидроксилауриновая	pp. <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	вв. <i>Ps. putida</i> , <i>P. aeruginosa</i> , pp. <i>Acinetobacter</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Bordetella</i>
65.	3hi13	3-гидроксиизотридекановая	в. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ,
66.	3h13	3-гидрокситридекановая	р. <i>Selenomonas</i> ; в. <i>Bacteroides hypermegas</i> ,
67.	3h14	3-гидроксимиристиновая	pp. <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	pp. <i>Alcaligenes</i> , <i>Salmonella</i>
69.	2,3hi14	2,3-дигидроксиизотетрадекановая	р. <i>Legionella</i>
70.	3h15	3-гидрокси-пентадекановая	в. <i>Bacteroides ruminicola</i>
71.	3hi15	3-гидроксиизо-пентадекановая	pp. <i>Flavobacterium</i> , <i>Prevotella</i> , в. <i>Bacteroides melanogonicus</i> ,
72.	2hi15	2-гидроксиизо-пентадекановая	р. <i>Flavobacterium</i>
73.	3ha15	3-гидроксиантеизо-пентадекановая	в. <i>Bacteroides ruminicola</i>
74.	3h16	3-гидрокси-пальмитиновая	pp. <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> , вв. <i>Campylobacter fetus</i> , <i>C. sputorum</i> , <i>C. fecalis</i>
75.	2h16	2-гидрокси-пальмитиновая	р. <i>Flexibacter</i> ; <i>Alcaligenes</i> , вв. <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Ralstonia pickettii</i> (2h16:1), клетки эпителия, спермий и другие эукариотические клетки
76.	3hi16	3-гидроксиизо-пальмитиновая	р. <i>Riemerella</i>
77.	3hi17	Гидроксиизо-гептадекановая	pp. <i>Bacteroides</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Cytophaga</i> , <i>Riemerella</i>
78.	2hi17	2-гидроксиизо-гептадекановая	р. <i>Bacteroides</i>
79.	3h17	3-гидрокси-гептадекановая	вв. <i>Bacteroides ruminicola</i> , <i>B. thetaiotaomicron</i>
80.	3ha17	3-гидроксиантеизо-гептадекановая	в. <i>Bacteroides ruminicola</i>
81.	10h18:1	10-гидрокси-октадеценная	в. <i>Clostridium perfringens</i>

82.	3h18	3-гидроксистеариновая	pp. <i>Francisella (F. philomiragia)</i> , <i>Brucella</i> , <i>Achromobacter</i> , в. <i>Helicobacter pylori</i>
83.	2h18	2-гидроксистеариновая	Простейшие
84.	10h18	10-гидроксистеариновая	в. <i>Clostridium perfringens</i>
85.	9,10 эпоху18	9,10-эпоксиоктадекановая	в. <i>Pneumocistis carinii</i>
86.	3h20	3-гидроксиэйкозановая	в. <i>Chlamydia trachomatis</i>
87.	3hi20	3-гидроксиизоэйкозановая	в. <i>Chlamydia trachomatis</i> , p. <i>Legionella</i>
88.	3h22	3-гидроксидокозановая	в. <i>Chlamydia trachomatis</i>
Спирты			
89.	16alc	n-пальмитиновый	p. <i>Moraxella</i>
90.	18alc, 2-ОН	Стеариновый, 2-ОН	p. <i>Mycobacterium MAIS</i> , n18 – <i>Moraxella</i>
91.	20alc	n-эйкозиловый	p. <i>Mycobacteria</i>
92.	2h20alc	2-оксиэйкозиловый	в. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
93.	2h22alc	2-оксидокозиловый	в. <i>Mycobacterium xenopii</i>
94.	2h24alc	2-окситетракозиловый	<i>Mycobacterium</i>
95.	2h26alc	2-оксигексакозиловый	<i>Mycobacterium</i>
Альдегиды:			
96.	12a	Лауриновый	p. <i>Butyrivibrio</i>
97.	13a	Тридекановый	p. <i>Butyrivibrio</i> , <i>Selenomonas</i>
98.	i14a	Изомиристиновый	pp. <i>Bifidobacterium</i> , <i>Butirivibrio</i>
99.	14:1Δ9a	9,11-тетрадеценовый	p. <i>Butyrivibrio</i> , в. <i>Clostridium fimetarium</i>
100.	14:1Δ11a	11,12-тетрадеценовый	p. <i>Butyrivibrio</i> , в. <i>Clostridium fimetarium</i>
101.	14a	Тетрадекановый	pp. <i>Butyrivibrio</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Spirochaeta</i> ,
102.	i15a	Изопентадекановый	pp. <i>Butyrivibrio</i> , <i>Lactobacillus (rumen)</i> , <i>Propionibacterium</i>
103.	a15a	Антеизопентадекановый	pp. <i>Butyrivibrio</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Frigoribacterium</i> , в. <i>Propionibacterium freudenreichii</i>
104.	15:1a	Пентадеценовый	p. <i>Butyrivibrio</i>
105.	15a	Пентадекановый	p. <i>Butyrivibrio</i>
106.	16:1Δ9a	9,10-гексадеценовая	pp. <i>Butyrivibrio</i> , <i>Selenomonas</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Mobiluncus</i> , в. <i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
107.	16:1Δ11a	11,12- гексадеценовый	в. <i>Clostridium fimetarium</i>
108.	16a	Пальмитиновый	в. <i>Clostridium fallax</i> , pp. <i>Lachnospira</i> , <i>Butyrivibrio</i> , <i>Lactobacillus</i>
109.	i17a	Изогептадекановый	в. <i>Propionibacterium freudenreichii</i>
110.	a17a	Антеизогептадекановый	p. <i>Eubacterium</i> , в. <i>Propionibacterium freudenreichii</i>
111.	17суca	Циклогептадекановый	p. <i>Clostridium</i>
112.	17a	Гептадекановый	p. <i>Lactobacillus (rumen)</i>
113.	i18a	Изостеариновый	pp. <i>Eubacterium</i> , <i>Lachnospira</i> , <i>Butyrivibrio</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Selenomonas</i> , <i>Mobiluncus</i> , в. <i>Clostridium butiricum</i>
114.	18:1a	Октадеценовый	pp. <i>Eubacterium</i> , <i>Clostridium</i>
115.	18a	Стеариновый	в. <i>Clostridium thermocellum</i>
116.	a16a	Антеизопальмитиновый	вв. <i>Clostridium acetobutyllicum</i> , <i>Cl. butiricum</i>
117.	19суca	Циклононадекановый	p. <i>Lactobacillus</i>
118.	19a	Нонадекановый	в. <i>Clostridium turobotiricum</i>
Стерины			
119.		Копростанол - холеста-	p. <i>Eubacterium</i>

		нол	
120.		Холестендиол	Простой герпес
121.		Холестадиенон	Цитомегаловирус
122.		Пневмоцистерол	вв. <i>Pneumocystis carini</i> , <i>P. hominis</i>
123.		Кампестерол	Микроскопические грибы
124.		Эргостерол	рр. <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-окси-антеизогептадекановая кислота.

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

5.1. Подготовка пробы к хромато-масс-спектрометрическому анализу

5.1.1. Общая схема пробоподготовки

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.

5.1.2. Рекомендации по обработке разных клинических проб

5.1.2.1. Кровь, слюна, ликвор

Кровь из пальца или из вены) в количестве не менее 100 мкл отбирают в пробирку с гепарином или ЭДТА (цитрат не рекомендуется) и помещают в холо-

дильник. Для анализа цельную кровь в количестве 40 мкл пипеткой переносят в виал, 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 соляной кислоты в метаноле, завинчивают плотно крышкой и подвергают кислому метанолизу при 80°C в течение 1 часа. К охлажденной реакционной среде добавляют 300 нг стандарта (дейтерометилловый эфир тридекановой кислоты), растворенного в гексане. Затем проводят экстракцию двумя порциями по 200 мкл гексана, встряхнув смесь на вортексе и позволяя ей отстояться в течение 5 мин при комнатной температуре. Объединенный экстракт переносят в чистый виал, высушивают 5-7 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 тот же виал, в котором проводили силилирование, и завинчивают его 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.

5.1.2.2. Моча

Пробу выстаивают при 5 °C 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 3 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 кислому метанолизу, согласно протоколу для крови.

5.1.2.3. Мокрота, гнойный экссудат, вагинальный секрет, эякулят.

Эти и другие густые субстанции готовят к анализу так же, как клетки крови - подсушивают 100 мкл пробы (всю пробу) и подвергают кислому метанолизу (см. 4.3.2.1.).

5.1.2.4. Биоптаты тканей.

Метанолиз биоптатов тканей (соединительная ткань, эпителий - в количестве 4-8 мг, мышечная ткань – 40 мг), проводят в 0,4 мл 1М HCl в метаноле при 80°C в течение часа. Образец ткани предварительно гомогенизируют растиранием в ступке. Дальнейшие операции проводятся в той же последовательности, что и при приготовлении проб крови.

5.1.2.5. Мазок с поверхности кожи

Транспортной средой микроорганизмов, обитающих в порах и на поверхности кожи, является кожное сало – себум. Его отбирают ватным тампоном на штоке, используемым для взятия мазков при микробиологическом исследовании, и хранят при комнатной температуре в сухом состоянии без транспортной среды неопределенно долго до анализа. Себум снимают круговым движением верхушечной части тампона с участка кожи 3-4 см². Затем головку тампона снимают и переносят в виал для кислого метанолиза, как в случаях, описанных выше. Для контроля артефактов анализируют отдельно вату тампона в холостом опыте.

5.2. Сканирование пробы

Для проведения анализа смесь эфиров в количестве 2 мкл вводят в инжектор ГХ-МС системы AT-5973 Аджилент Технолоджис (Agilent Technologies Inc.) (США) вручную или посредством автоматической системы ввода проб (автосэмплер), которая обеспечивает воспроизводимость времен удерживания хроматографических пиков и повышает точность автоматической обработки данных.

Хроматографическое разделение пробы осуществляют на капиллярной колонке с метилсиликоновой привитой фазой HP-5ms Аджилент технолоджис длиной 25м и внутренним диаметром 0,25мм, газ-носитель - гелий. Режим анализа - программированный, скорость нагрева термостата колонки 7 °С/мин в диапазоне

135 - 320°C. Выдержка при начальной температуре 1,5 мин. Температура испарителя – 250°C, интерфейса – 250 - 300°C. 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. Анализ биологических жидкостей человека проводят в основном методом МФ по селективным ионам, а 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	Общий ЖК от C10- до C16: Δ 11 3h (общий) h10 (M-15) h12 (M-15) 2h12 i,a15a i16	pp. <i>Clostridium</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Ruminococcus</i> , в. <i>Nocardia asteroides</i> pp. <i>Neisseria</i> , <i>Acinetobacter</i> p. <i>Pseudomonas</i> pp. <i>Pseudomonas</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Moraxella</i> в. <i>P. aeruginosa</i> , p. <i>Acinetobacter</i> p. <i>Butyrivibrio</i> p. <i>Streptomyces</i>

		301,2 75,1 90,1	hi13, H13 Жирные альдегиды C13CD ₃	pp. <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Selenomonas</i> pp. <i>Propionibacterium</i> , <i>Eubacterium</i> Дейтеротридекановая кислота, внутренний стандарт
		103,1 186,2	Жирные спирты 10:0	Компоненты кожного сала p. <i>Streptococcus (оральные)</i>
2	12,3 после C16:1	271,2 175,2 315,3	2h14 3h, общий h14 M	p. <i>Alcaligenes</i> p. <i>Fusobacterium</i> , сем. <i>Enterobacteriaceae</i> pp. <i>Fusobacterium</i> , <i>Haemophilus</i> , сем. <i>Enterobacteriaceae</i>
		103,1 75,1 253,2	Жирные альдегиды i16a	Компоненты кожного сала в. <i>Eubacterium lentum</i> в. <i>Eubacterium lentum</i>
3	12,8 После 3h14	87,1 285,2 250,2 298,3 175,2 75,1	i,a,n17:0; 10Me16; 18:1 Δ11 2h (общий), 2hi15 17сус, i17:1 и 17:1 i18 3h общий Жирные альдегиды	Коринеформы <i>CDC</i> , <i>Propionibacterium</i> , pp. <i>Rhodococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> p. <i>Flavobacterium</i> . сем. <i>Enterobacteriaceae</i> , pp. <i>Candida</i> , <i>Campylobacter</i> в. <i>Clostridium difficile</i> p. <i>Prevotella</i> p. <i>Eubacterium</i> , в. <i>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	в. <i>C. perfringens</i> , p. <i>Malassesia</i> pp. <i>Staphylococcus</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Streptococcus mutans</i> pp. <i>Bifidobacterium</i> , <i>Enterococcus</i> pp. <i>Eubacterium</i> , <i>Bifidobacterium</i> в. <i>Chlamidia trachomatis</i> в. <i>Chlamidia trachomatis</i> pp. <i>Prevotella</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Burkholderia</i> , в. <i>Helicobacter pylori</i> , pp. <i>Staphylococcus</i> , <i>Mycobacteria</i> pp. <i>Enterococci</i> , <i>Afipia</i> , в. <i>Helicobacter mustelae</i> pp. <i>Mycobacteria</i> , <i>Corinebacterium</i> Микроскопические грибы в. <i>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 p. <i>Eubacterium</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 корректируют под параметры хроматографической колонки и ГХ-МС прибора пользователя.

5.3. Сбор данных и первичный протокол площадей аналитических пиков

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

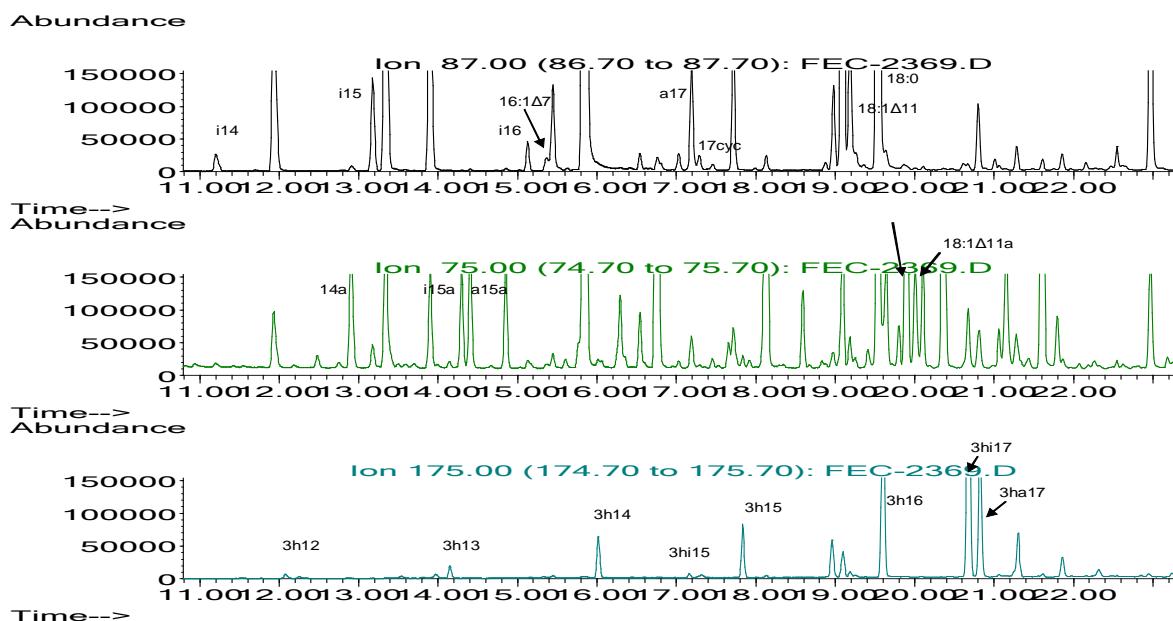


Рис. 1. Селективные хроматограммы жирных кислот (ион 87, верхний рисунок), жирных альдегидов (ион 75, рисунок в середине) и гидрокси-кислот (ион 175, нижний рисунок), экстрагированных из клинического материала, содержащего микроорганизмы и/или их маркеры.

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-окси-антеизогептадекановая кислота, 2h24alc - 2-окситетракозиловый спирт.

Частично, данные автоматической обработки требуют ручной проверки измерения пиков. Это относится к неполностью разделенным на хроматограмме пикам или малым пикам, находящимся в соседстве с более интенсивными. Эти пики находят руководствуясь закономерностями их появления на хроматограмме - т.е. абсолютными и относительными временами удерживания, подтверждением дополнительными ионами и соотношением площадей ионов. Для облегчения поиска нужного иона используют шаблоны.

Существуют некоторые общие закономерности расположения пиков жирных кислот и альдегидов при анализе на применяемом типе колонок и режиме анализа:

1. Нормальные прямоцепочечные ЖК образуют сетку маркерных пиков, которые выходят через равные промежутки времени. Их место при необходимости можно находить, измеряя промежутки линейкой на хроматограмме.

2. 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

3. Оксикислоты появляются сразу после нормальной кислоты, которая на два атома углерода больше, чем сама оксикислота. 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 под ней) кислоты совпадают по времени выхода с C20:0.

4. Общим для простых ЖК является ион 87, для оксикислот - ион 175, жирных альдегидов – ион 75.

В таблице 3 приведены характеристики некоторых маркеров для проведения измерений площадей пиков вручную.

Таблица 3. Основные характеристики некоторых маркеров

Время удерживания	Маркер	Химическая формула	Мол.масса (Ме-ТМС произв.)	Основной ион	Доп. ион
8,75	3h10	$C_7H_{15}-\underset{\substack{ \\ OH}}{CH}-CH_2-C \begin{matrix} \nearrow O \\ \searrow OH \end{matrix}$	188 (274)	175	259
9,91	C13CD3	$C_{12}H_{25}-C \begin{matrix} \nearrow O \\ \searrow O-CD_3 \end{matrix}$	231 (357)	90	-
12,25	3h12	$C_9H_{19}-\underset{\substack{ \\ OH}}{CH}-CH_2-C \begin{matrix} \nearrow O \\ \searrow OH \end{matrix}$	216 (302)	175	287
12,30	2h12	$C_{10}H_{21}-\underset{\substack{ \\ OH}}{CH}-C \begin{matrix} \nearrow O \\ \searrow OH \end{matrix}$	216 (302)	243	287
15,36	16:1d7	$C_8H_{17}-CH=CH-(CH_2)_5-C \begin{matrix} \nearrow O \\ \searrow OH \end{matrix}$	255 (341)	87	-
16,03	3h14	$C_{11}H_{23}-\underset{\substack{ \\ OH}}{CH}-CH_2-C \begin{matrix} \nearrow O \\ \searrow OH \end{matrix}$	244 (330)	175	315

16,08	2h14	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{CH}(\text{OH})-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	244 (330)	271	315
17,29	3hi15	$\text{iso-C}_{12}\text{H}_{25}\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	258 (344)	175	329
19,64	3h16	$\text{C}_{13}\text{H}_{27}\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	272 (358)	175	-
20,56	3hi17	$\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	286 (372)	175	357
20,85	a19	$\text{C}_2\text{H}_5-\text{CH}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_{14}-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	274 (360)	87	312
22,95	3h18	$\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	300 (386)	175	371
22,91	10h18	$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{CH}(\text{OH})-(\text{CH}_2)_8-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	300 (384)	273	-
25,46	3hi20	$\text{iso-C}_{17}\text{H}_{35}\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	328 (414)	399	175
11,22	i14	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_{10}-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	228	87	-
13,21	i15	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_{11}-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	242	87	-
17,08	i17	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_{13}-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	270	87	-
17,78	17:0	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{15}-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	270	87	-
18,93	i18	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_{14}-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	284	298	-

При определении площадей малых пиков (для которых высота пика сопоставима с шумом нулевой линии) базовая линия проводится примерно по центру колебаний фона (Рис.2).

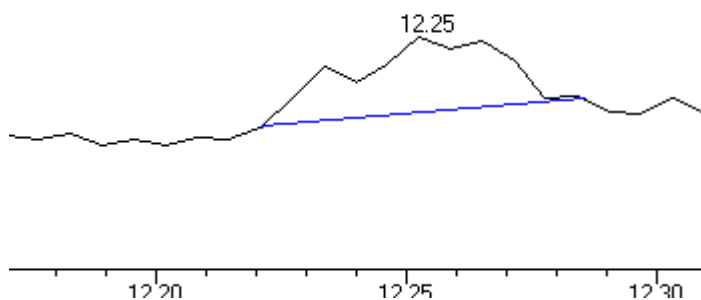


Рис. 2. Проведение базовой линии в случае высоты пика, сопоставимой с фоновыми колебаниями.

В случае наложения одного пика на другой или наличия тренда сигнала базовая линия проводится по прямой, примерно соответствующей этому тренду (Рис. 3).

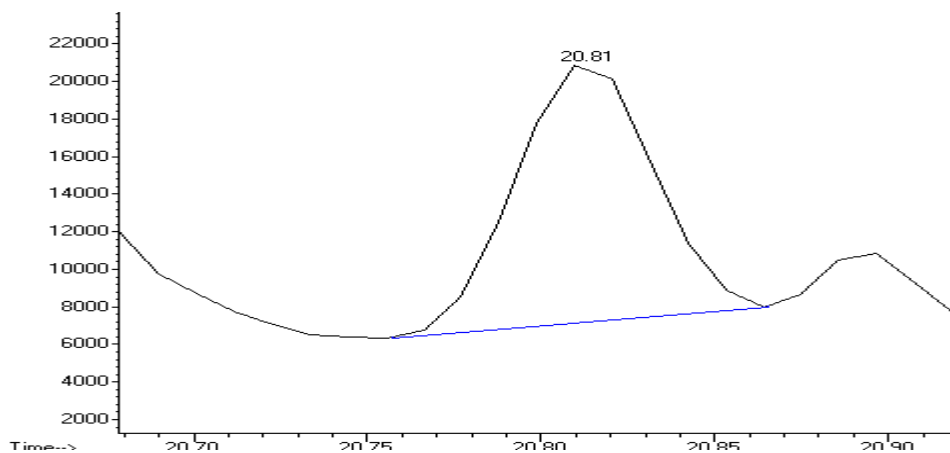


Рис. 3. Проведение базовой линии в случае тренда или наложения одного пика на другой.

Исключение составляет маркер 16:1d7, для которого базовая линия отклоняется горизонтально, а граница пика проводится либо в точке между пиками (Рис. 4а), либо в точке перегиба (Рис. 4,б).

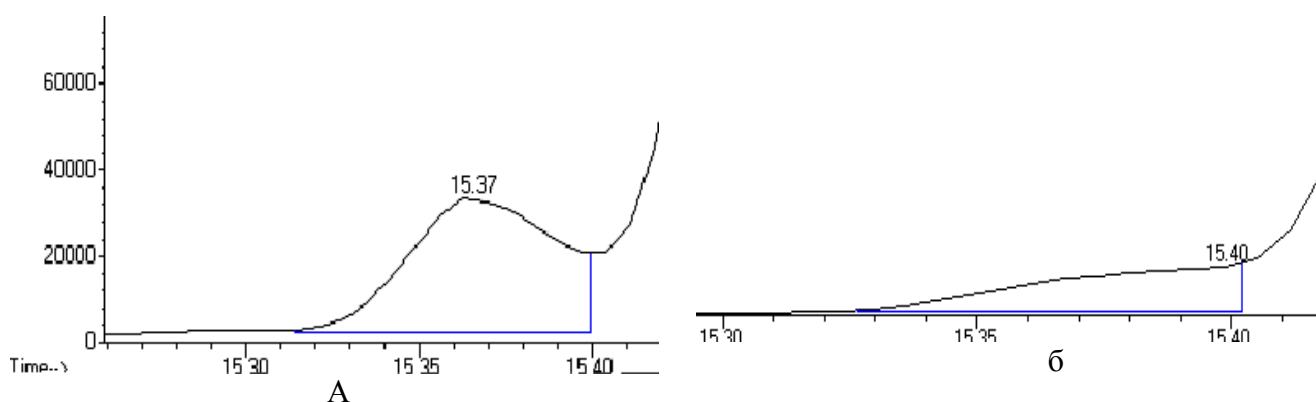


Рис. 4. Проведение базовой линии для маркера 16:1d7.

Для маркеров, характеризующихся двумя ионами, наличие сигнала ионного тока в обеих хроматограммах обязательно. Если пик с соответствующим временем удерживания фиксируется только для одного иона, то наличие компонента не считается доказанным. Площадь пика рассчитывается по хроматограмме основного иона. Допускается незначительное (не более 0,1 мин) расхождение во временах удерживания маркеров относительно значений, приводимых в таблице. Шаблоны для первичной верификации данных распечатывают на принтере, используя собственные измерения.

5.4. Интерпретация результатов.

Выявление таксономически значимых жирных кислот.

Разработанная в ходе многочисленных предшествующих биомедицинских исследований биологических жидкостей и тканей человеческого организма в норме и при патологии программа детектирования микробных маркеров приведена в Таблице 4. Метод сбора данных универсален и корректируется лишь при изменении параметров хроматографической колонки в ходе эксплуатации или при ее смене.

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 (Jantzen, Bryn 1985; McNabb et al., 1997; Вейант, 1999). Кроме того, на веб-сайтах некоторых микробных коллекций в свободном доступе наряду с последовательностями гена 16S рРНК имеются также и жирнокислотные профили многих изолятов (Culture Collection, University of Göteborg, Sweden, www.ccug.se).

Расчет концентрации маркеров и отнесение их к конкретным микроорганизмам проводят по программному продукту, поставляемому разработчиком.

Программный продукт состоит из следующих компонент:

1. Состав и порядок детектирования специфических ионов при ГХ-МС анализе (метод сбора данных), задаваемый в рамках программного обеспечения прибора (группа файлов в формате программы сбора данных прибора) – файл формата `method.m`;

2. Макрос обработки данных формы в файле `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.

Номер	Вещество	Время	Ион	Площадь, А	A/10000
1)	10:0	4,70	87	0	0
2)	i16a	16.08	75	622509	62
3)	a13	9.35	87	0	0
4)	i14	11.24	87	36567	4
5)	14:1	11,52	87	8670	1
6)	14:1d11	11,69	87	89411	9
7)	i12	7,16	87	0	0
8)	3h12	12,07	175	4768	0
9)	2h12	0.00	243	6026	1
10)	i15	13,17	87	202644	20
11)	a15	13,33	87	278722	28
12)	15:1	13,56	87	0	0
13)	hi13	13.45	175	0	0
14)	3h13	14.09	175	0	0
15)	10Me15	14,84	87	35304	4
16)	i16:1	14.76	87	12523	1
17)	i16	15.29	87	1087194	109
18)	16:1d7	15.38	87	692130	69
19)	3h14	16,02	175	14171	1
20)	2h14	16,07	271	12489	1
21)	17:0	17.93	87	7276735	728
22)	2hi15	17.24	285	0	0
23)	10Me16	16.94	87	555626	56
24)	i17	17.23	87	3282579	328
25)	3hi15	17.17	175	0	0
26)	a17	17.38	87	1585912	159
27)	18:1d11	19.30	87	17040000	1704
28)	i17:1	16.75	250	6180	1
29)	17:1	17.47	250	168464	17
30)	17cyc	17.62	250	0	0
31)	16:1a	16.36	75	0	0
32)	i18	18,90	298	74345	7
33)	10Me17	18.30	87	0	0
34)	h16	19,62	175	87206	9
35)	18:1d11a	20.05	75	7256723	726
36)	3hi17	20.75	175	0	0
37)	a19	20.80	87	285680	29
38)	18:1a	19.95	75	14724631	1472
39)	h18	23.06	175	39279	4
40)	10h18	23.10	273	54486	5
41)	19cyc	20,90	278	49148	5
42)	Coprostanol	33.74	370	9262	1
43)	a17a	18.30	75	1402461	140
44)	20:1d11	22,66	87	198871	20
45)	Cholestendiol	36,18	456	24329	2
46)	Campesterol	35,86	343	421172	42
47)	16:1d9t	15,45	87	221139	22
48)	Cholestadienon	34,73	382	15101	2
49)	b-Sitosterol	37.56	396	317613	32
50)	i15a	14,16	75	17982	2
51)	16:1d11	15,53	87	383259	38
52)	10Me14	12,91	87	85249	9
53)	14a	8.33	75	259753	26
54)	19cyca	21.62	75	0	0
55)	h15	17.86	175	0	0
56)	a15a	14.40	75	111787	11
57)	10h16	35,89	342	0	0
58)				94312	9
59)	C13CD3st	9.91	90	5151512	1236
	Cholesterol	35,14	370	5073019	507
	11Me18:1			34554	3
	20:1			952250	95
	2-C20alk			0	0

1. Группа формул для расчета численности микроорганизмов с учетом возможного происхождения ЖК из клеток разных таксонов.

Площадь пика маркера пропорциональна его концентрации, а, следовательно, концентрации соответствующего микроорганизма, которая определяется как число клеток N_1 в единице объема или веса пробы по формуле:

$N_1 = A_i [M_{st} / (q_2 \times M_{sam} \times A_{st})] / R_{i_1}$, где выражение в квадратных скобках, постоянный коэффициент:

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

В этих формулах A_i – площадь пика маркера, M_{st} – количество введенного в пробу стандарта в мг, M_{sam} – количество пробы, A_{st} – площадь пика стандарта, R_{i_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.

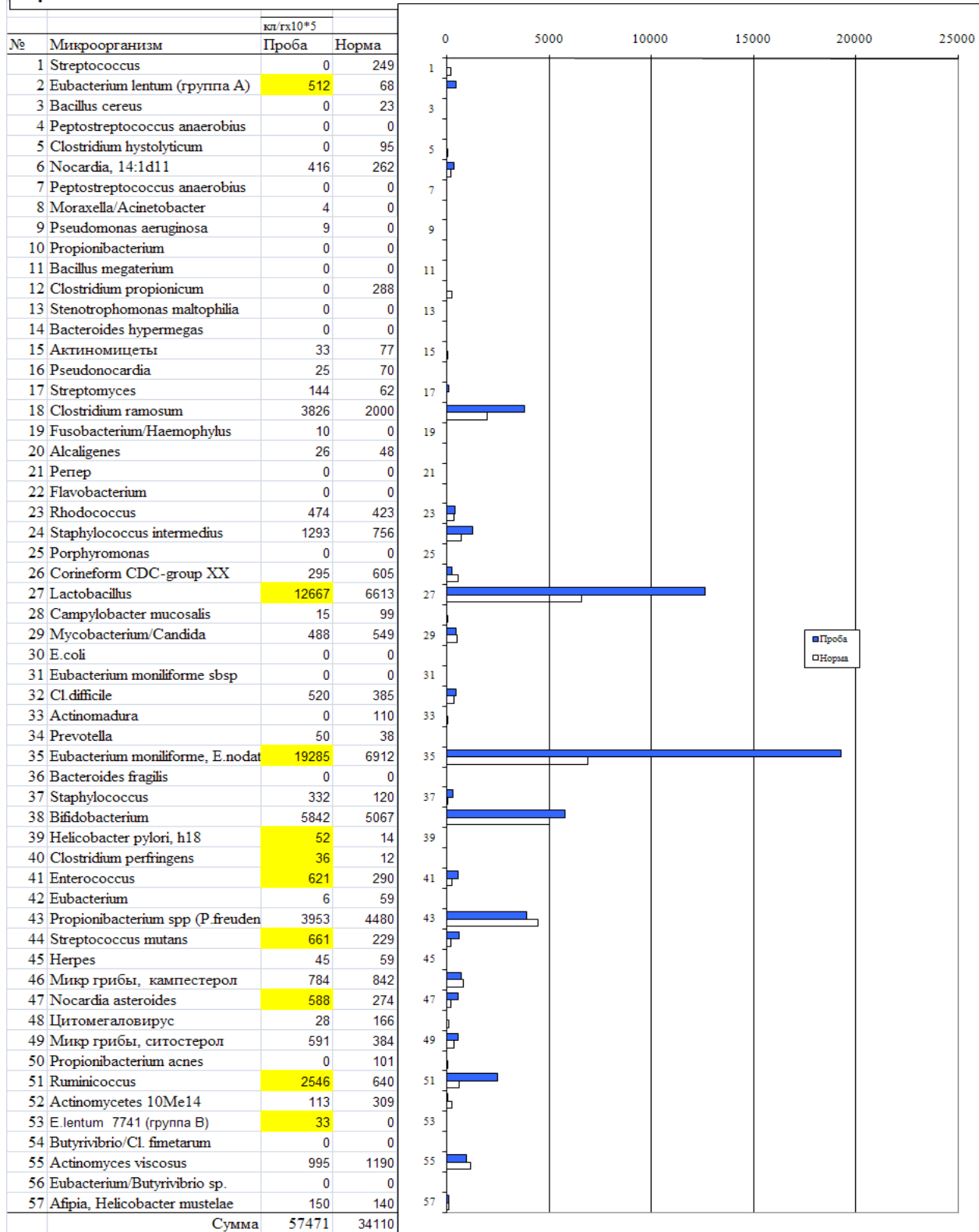
Соответственно, число клеток любого следующего микроорганизма можно рассчитать по аналогичной формуле $N_2 = A_i \times k / R_{i_2}$ и так далее, умножая площади пика A_i маркера, по которому проводятся вычисления, на коэффициент k и деля на содержание маркера (в %) в составе ЖК этого микроорганизма.

Streptococcus	10;0	N	=F77*C1/3,6
Eubacterium lentum	i16a	N	=(F77*C2-5,44*D7)/11,3
Bacillus cereus	a13	N	=(F77*C3-0,1*D32-5*D7)/3,9
Баланс	i14	N	=(F77*C4-4*D2-2*D33-1*D3-8,9*D7-2*D22-14*D16-2*D13-0,4*D17)/3
Clostridium histolyticum	14;1	N	=(5*F77*C5-1,33*D28-0,8*D7-1,6*D32)/10,6
Nocardia, 14:1d11	14:1d11	N	=5*F77*C6/10
Peptostreptococcus anaerobiu	i12	N	=F77*C7/5,68
Acinetobacter	3h12	N	=(F77*C8-3*D9-2*D13)/4
Pseudomonas aeruginosa	2h12	N	=F77*C9/6
Propionibacterium	i15	N	=(F77*C10-5*D33-0,8*D32-9,7*D3-8*D37-11*D36-36*D22-3,2*D26-4,9*D16-0,9*D7-23*D25-30*D13-9*D37-8,2*
Bacillus megaterium	a15	N	=(F77*C11-3*D33-21,86*D34-25*D37-0,3*D32-7*D50-5,2*D7-33*D36-12,4*D3-3*D17-21*D2-3,6*D12)/74
Clostridium propionicum	15;1	N	=(5*F77*C12-0,4*D32-1,2*D5-0,6*D16-0,5*D47-4,5*D14)/4
Stenotrophomonas maltophilia	hi13	N	=F77*C13/8
Bacteroides hypermegas	3h13	N	=F77*C14/10
Актиномицеты	10Me15	N	=F77*C15/10
Pseudonocardia	i16:1	N	=(5*F77*C16-7*D33)/30
Streptomyces	i16	N	=(F77*C17-26*D33-1*D3-0,7*D36-7,6*D32-2,8*D2-43*D16-2,1*D25-1*D13-1*D37)/27,4
Clostridium ramosum	16:1d7	N	=(5*F77*C18-2,1*D31-1,51*D29-2,2*D44)/7,84
Fusobacterium/Haemophylus	3h14	N	=(F77*C19-6*C30)/13
Sphingomonas	2h14	N	=F77*C20/4,5
Ренер	17;0	N	
Flavobacterium	2hi15	N	=F77*C22/20
Rhodococcus	10Me16	N	=(F77*C23)/10,9
Баланс	i17	N	=(C24*F77-3*D17-1,5*D26-1*D33-5,4*D3-0,69*D34-8,5*D50-2,7*D43-0,9*D7-1,4*D36-2,1*D32-2*D16-9*D
Porphyromonas	3hi15	N	=F77*C25/19
Corineform(Listeria) a17	a17	N	=(F77*C26-11*D37-9,5*D17-7*D3-2,3*D36-0,6*D34-1,3*D31-1*D50-1,7*D7-1,9*D32-3,1*D16)/30
Lactobacillus	18:1d11	N	=(5*F77*C27-19*D30-5,3*D31-8*D39-1,3*D7-2*D8-3,8*D38-8,26*D28-7,5*D20-25*D9-12,8*D18)/56,9
Campylobacter mucosalis	i171 l	N	=1*F77*C28/3,88
Mycobacterium/Candida	17;1	N	=(7*F77*C29-4*D8-2*D33-3,3*D32-1,7*D5-1*D30-1,2*D23-2,2*D47)/15,4
E.coli	17cyc	N	=(5*F77*C30-8,1*D20-5*D9)/11
Eubacterium moniliforme	16:1a	N	=(C31*F77)/3,05
Cl.difficile	i18	N	=(7*F77*C32-0,6*D7)/9,3
Actinomadura	10Me17	N	=(F77*C33-1,7*D23)/33
Prevotella	h16	N	=(F77*C34-7*D25-3*D39-6,1*D36-1,6*D28-4*D22-5,5*D19)/11,49
Summed feature 1	18:1d11a	N	=F77*C35/3,5
Bacteroides fragilis	3hi17	N	=(F77*C36-12*D22-10*D25)/23,2
Staphylococcus	a19	N	=F77*C37/8
Bifidobacterium	18:1a	N	=(C38*F77-5,64*D31-2,81*D7-3*D35)/13,54
Helicobacter pylory, h18	h18	N	=C39*F77/7
Clostridium perfringens	10h18	N	=F77*C40/14
Enterococcus	19cyc	N	=(7*F77*C41-2*D30-4,4*D20-3*D9)/5
Eubacterium	Coprostanol	N	=F77*C42/14
Propionibacterium freudenreic	a17a	N	=(F77*C43)/3,3
Streptococcus	20:1d11	N	=5*F77*C44/14
Herpes	Cholestendiol	N	=F77*C45/5
Микр грибы	Campesterol	N	=F77*C46/5
Nocardia asteroides	16:1d9t	N	=(7*F77*C47)/24,5
Цитомегаловирус	Cholestadienor	N	=F77*C48/5
Микр грибы	b-Sitosterol	N	=F77*C49/5
Propionibacterium acnes	i15a	N	=(F77*C50-1,71*D2-0,5*D56)/5,5
Ruminococcus	16:1d11	N	=(5*F77*C51)/7
Actinomycetes 10Me14	10Me14	N	=C52*F77/7
E.lentum 7741	14a	N	=(C53*F77-5*D56-4,2*D2)/22,3
Enterococcus faecalis	19cyc a*	N	=F77*C54/3,6
Bacteroides ruminicola	h15	N	=F77*C55/3,6
Eubacterium spp.	a15a	N	=(F77*C56-3,43*D2)/7,7
Микр грибы	Ergosterol	N	=F77*C57/5
	i14a	N	=F77*C58/5
St. 345 ng	C13CD3		
	Cholesterol		
Afipia	11Me18:1	N	=F77*7*C61/15
Actinomyces	20;1	N	=F77*C62/8,9
Mycobacterium tuberculosis	2-C20alk	N	=F77*C63/8,9

Лист 3 - Конечный результат в сопоставлении с нормой.

Результаты исследования состава микробных маркеров в крови методом газовой хроматографии - масс-спектрометрии.

Проба NT-6055 X-а Н.А.



Проба NT-6055 X-а Н.А. . Микробные маркеры в крови.

Суммарный избыточный рост микроорганизмов при доминировании эубактерий и лактобацилл.

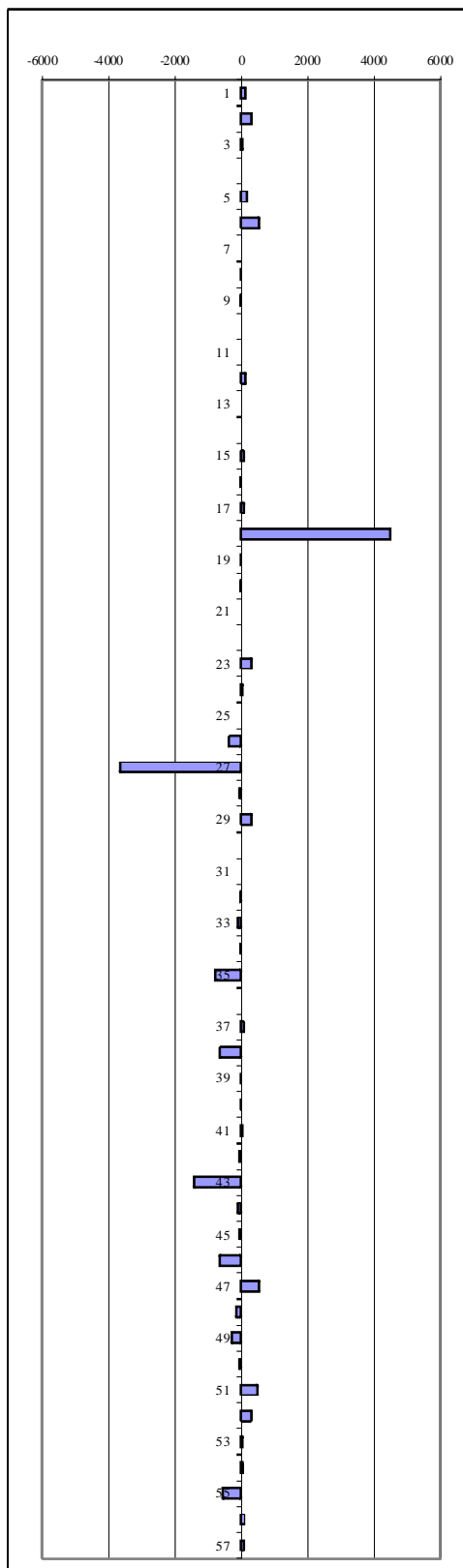
Анализ выполнил
www.rusmedserv.com/microdiag/
Tel: /095/ 254 67 40
8-903-558-31-26 моб

Осипов Г.А. 28.04.2008
osipovga@mail.ru

Диаграмма дисбиоза

Проба НТ-5999 С. И. В.

№	Микроорганизм	
1	Streptococcus	128
2	Eubacterium lentum (группа А)	312
3	Bacillus cereus	51
4	Peptostreptococcus anaerobius	0
5	Clostridium histolyticum	180
6	Nocardia, 14:1d11	556
7	Peptostreptococcus anaerobius	0
8	Moraxella	13
9	Pseudomonas aeruginosa	11
10	Propionibacterium	0
11	Bacillus megaterium	0
12	Clostridium propionicum	135
13	Stenotrophomonas maltophilia	0
14	Bacteroides hypermegas	0
15	Актиномицеты	76
16	Pseudonocardia	6
17	Streptomyces	98
18	Clostridium ramosum	4493
19	Fusobacterium/Haemophilus	14
20	Klebsiella 2h14	1
21	Ренет	0
22	Flavobacterium	0
23	Rhodococcus	321
24	Staphylococcus intermedius	52
25	Porphyromonas	0
26	Corineform CDC-group XX	-354
27	Lactobacillus	-3651
28	Campylobacter mucosalis	-38
29	Mycobacterium/Candida	328
30	E.coli	0
31	Eubacterium moniliforme	0
32	Cl.difficile	-30
33	Actinomadura	-110
34	Prevotella	8
35	E. moniliforme, E.nodatum, E.sal	-773
36	Bacteroides fragilis	0
37	Staphylococcus	72
38	Bifidobacterium	-640
39	Helicobacter pylory, h18	14
40	Clostridium perfringens	14
41	Enterococcus	32
42	Eubacterium	-59
43	Propionibacterium freudenreichii	-1431
44	Streptococcus	-103
45	Herpes	-39
46	Микр грибы, кампестерол	-658
47	Nocardia asteroides	542
48	Цитомегаловирус	-148
49	Микр грибы, ситостерол	-287
50	Propionibacterium acnes	-39
51	Ruminococcus	498
52	Actinomycetes 10Me14	307
53	E.lentum 7741 (группа В)	44
54	Enterococcus	62
55	Actinomyces viscosus	-565
56	Eubacterium spp.	110
57	Afipia, Helicobacter mustelae	81
Сумма		-365



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

При анализе всех компонентов/маркеров в совокупности нетрудно определить род или вид присутствующего микроорганизма, либо исключить те или иные виды из списка предполагаемых. Обычно анализ начинается именно с операции ис-

ключения микроорганизмов, маркеры которых отсутствуют: например, отсутствие оксикислот сразу же исключает из анализа грамотрицательные микробы, отсутствие альдегидов – большую группу плазмодогенсодержащих организмов; наличие/отсутствие α -оксикислот предполагает или отвергает наличие определенных видов, для которых характерны сфинголипиды, включающие в себя эти α -оксикислоты (в отличие от β -оксикислот ЛПС). Наличие ненасыщенных, циклопропановых, разветвленных изомеров и их комбинаций лежит в основе алгоритма идентификации.

Количественные изменения некоторых микробных маркеров при заболеваниях различной этиологии показаны на хроматограммах (Рис. 5 - 7).

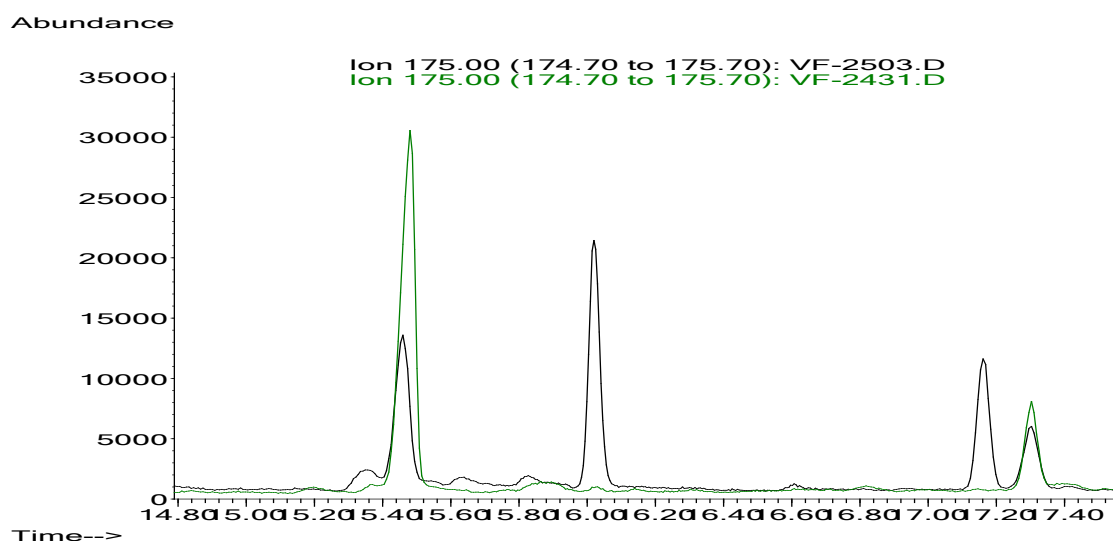


Рис. 5. Концентрация маркера сем. *Enterobacteriaceae* – β -оксимиристиновой кислоты (h14) – время по шкале абсцисс 16.02 мин – при заболевании (верхняя кривая) по сравнению с нормой (нижняя кривая)

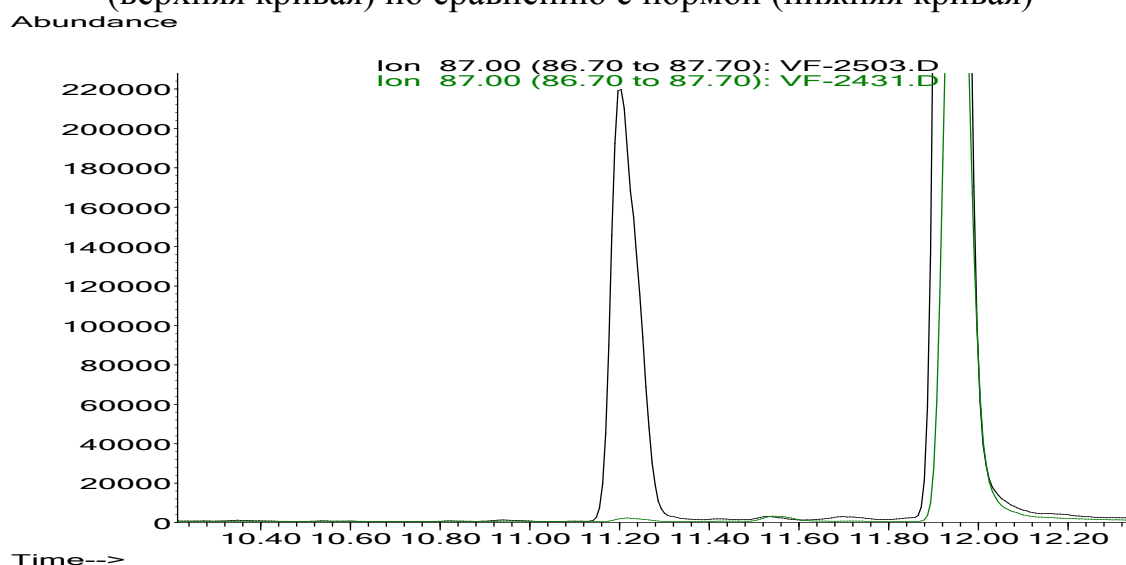


Рис 6. Маркер анаэробного пептострептококка – изо-миристиновая кислота, i14 (время выхода 11.23). Его концентрация возросла в 50 раз у больного по

сравнению с уровнем нормы (нижняя кривая; большой пик справа – миристиновая кислота фона)

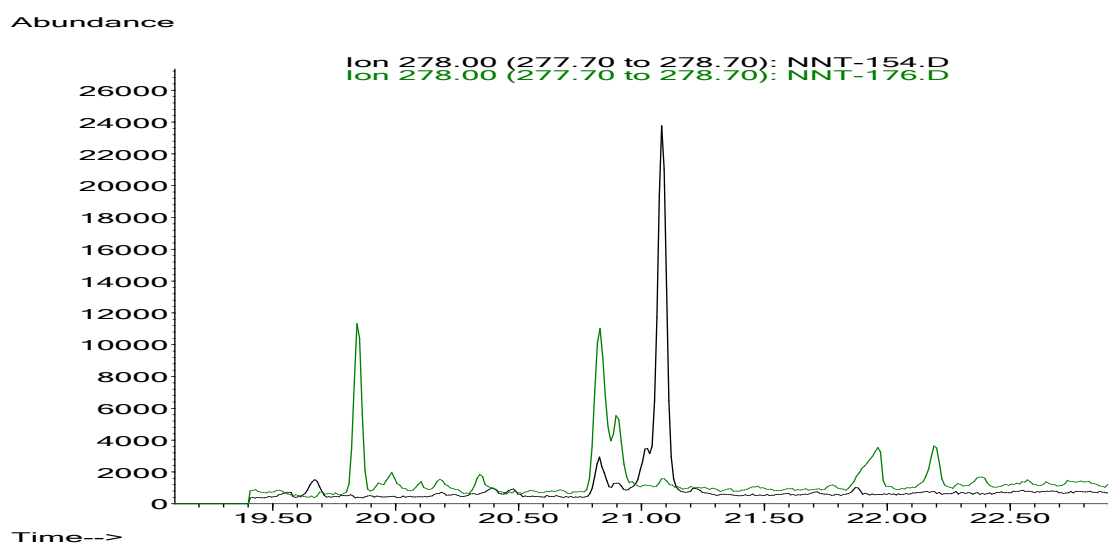


Рис 7. Концентрация 11,12-цикло-нонадекановой кислоты, маркера *Enterococcus spp* (время выхода 21.1 мин) у ребенка с некротическим энтероколитом (верхняя кривая) увеличена в 30 раз по сравнению с уровнем нормы (нижняя кривая).

6. ВОЗМОЖНЫЕ ЛОЖНОПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ И ЛОЖНООТРИЦАТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И СПОСОБЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Ложноположительные результаты могут возникать при появлении вблизи пика маркера хроматографического пика случайной примеси вследствие погрешностей в ходе пробоподготовки или при применении некачественных растворителей. Во избежании эффекта следует строго придерживаться методики и чистоты проведения операций и использовать реактивы необходимой чистоты.

Ложноотрицательные результаты могут возникнуть вследствие потери чувствительности аппаратуры. Для их предотвращения достаточно поддерживать технические характеристики прибора (чувствительность, разрешающая способность) в соответствии с паспортными данными, проводя своевременно профилактику и настройку.

7. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ

В качестве примеров приведены результаты систематических исследований инфекции и дисбиозов.

Определение состава микроорганизмов в мокроте больных муковисцидозом.

Работа проведена в Центре муковисцидоза РДКБ, (80 пациентов). Это исследование, проведенное с целью выявления анаэробной составляющей в мокроте пациентов, показало наряду с наличием традиционно известных агентов муковисцидоза (псевдомонады, стафилококки и др.) в мокроте обнаруживаются маркеры анаэробов pp. *Clostridium*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Actinomyces* и других. Причем анаэробы доминируют в микст-инфекции (Рис. 8).

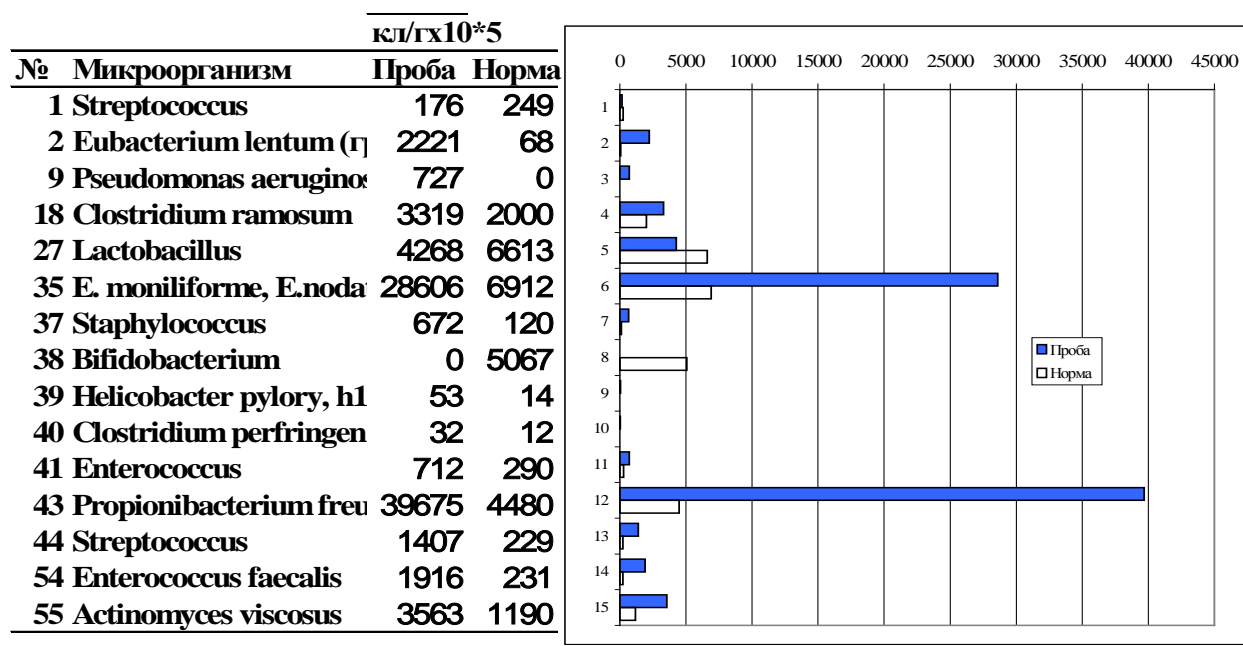


Рис 8. Микробное сообщество в мокроте больных муковисцидозом.

Реконструкция микст-инфекции при пиелонефрите по микробным маркерам в моче. Работа проведена в ДГКБ № 13 им. Н.Ф.Филатова (60 пациентов). В ходе исследования было показано, что:

1. В моче доминируют маркеры анаэробов *Propionibacterium freudenreichii*, клостридий *Clostridium histolyticum* и *C. propionicum*, специфичных для кишечника;
2. Значительно повышена концентрация маркеров *Alcaligenes*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Moraxella*;

3. Кишечные микробы создают мукус повышенной (в присутствии *P. freudenreichii*) вязкости, способствующий размножению многочисленных видов микроорганизмов и физически препятствующий обменным процессам;
4. Аналогичную комбинацию кишечных микробов с *Alcaligenes* и *P. aeruginosa* наблюдали в случае с муковисцидозом легких, где эта ассоциация устойчиво повторяется у большой серии обследованных в РДКБ больных (Рис. 9).

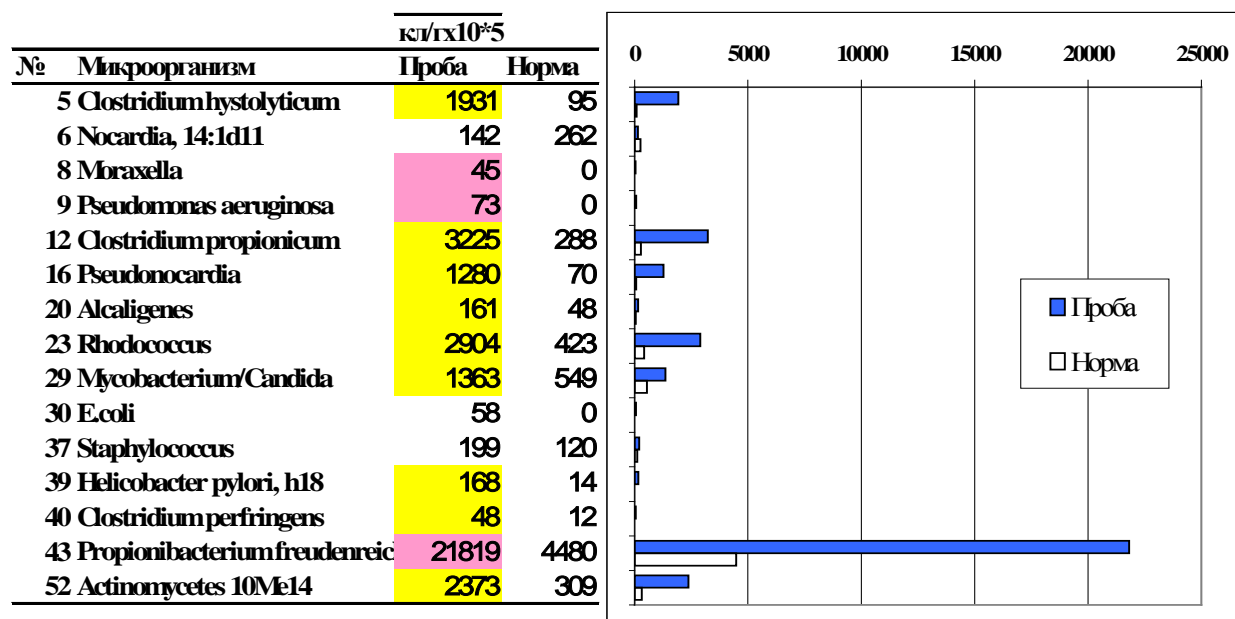


Рис 9. Микст-инфекция при пиелонефрите.

Исследование микробиоты кишечника детей, больных атопическим дерматитом. Работа проведена в ЦНИКВИ им Короленко (75 пациентов) У больных атопическим дерматитом в микробиоте пристеночного слоя кишечника (по микробных маркеров в крови) обнаружили дефицит бифидобактерий при избыточном росте видов *Eubacterium*, *Propinibacterium freudenreichii*, нокардий и других микроорганизмов (Рис. 10).

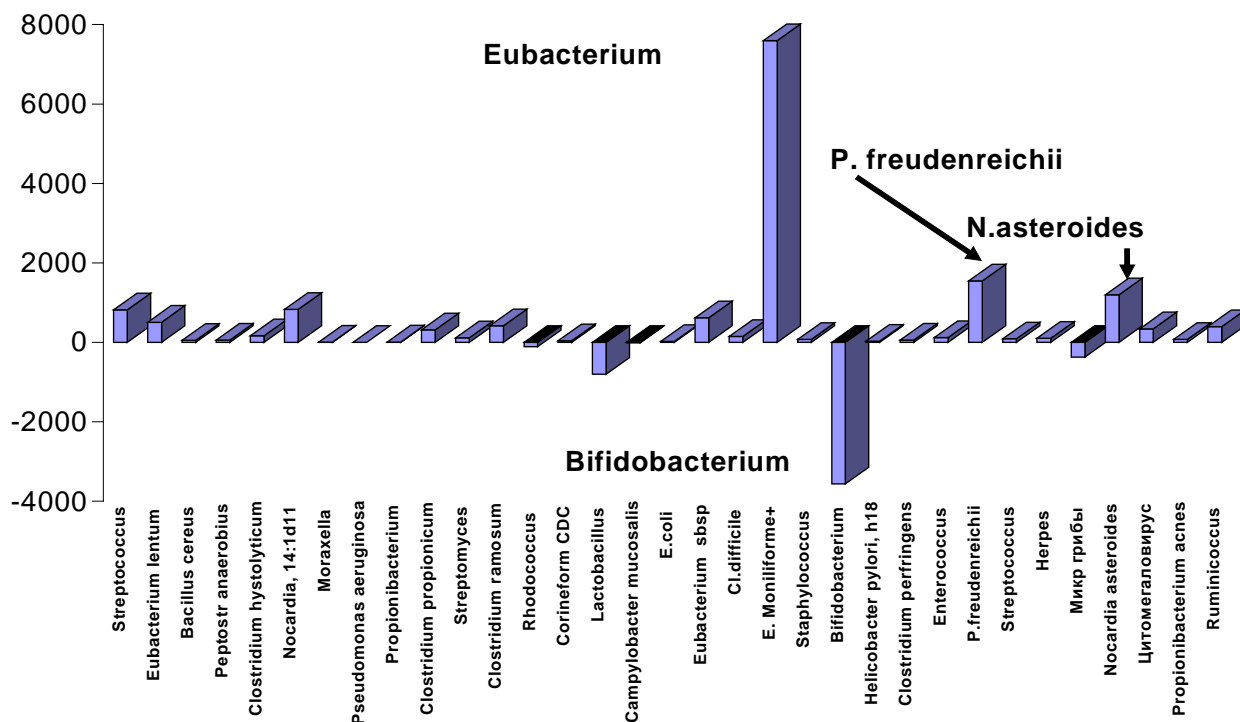


Рис 10. Картина дисбиоза при atopическом дерматите.

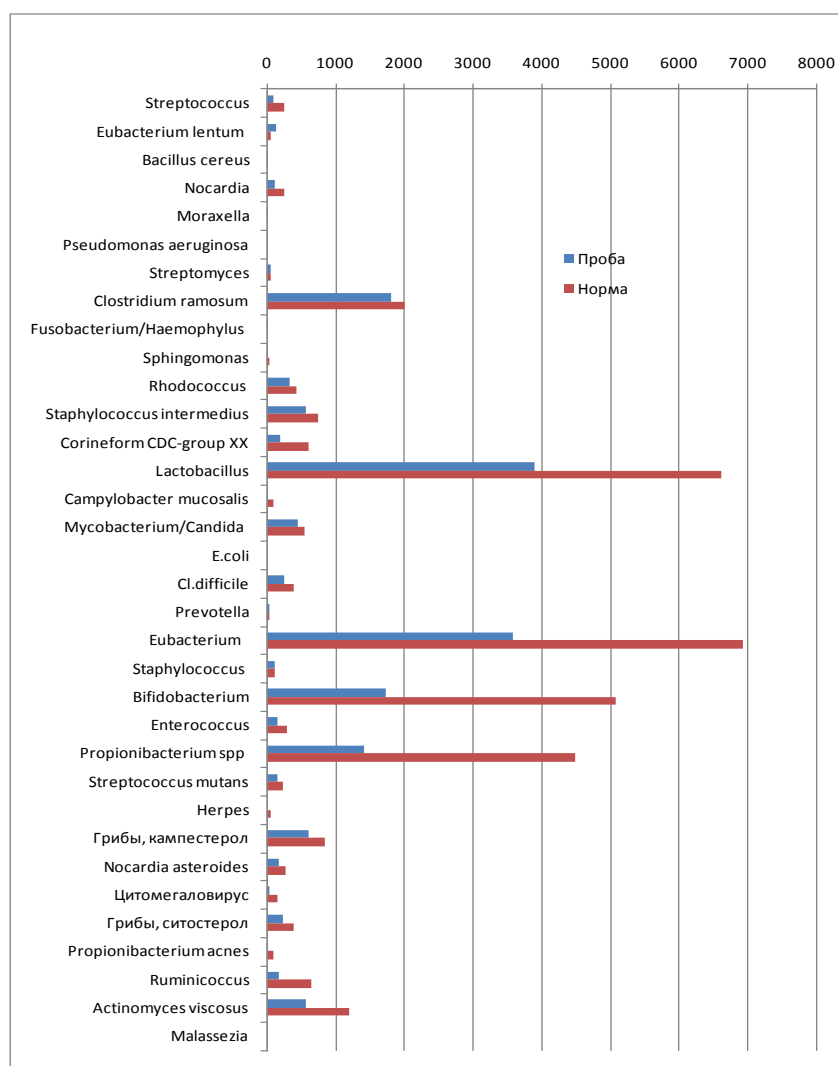
Микробные маркеры в крови при септических состояниях. Методом ГХ-МС было выявлено многократное превышение концентрации маркеров *Lactobacillus spp.* и клостридий группы *Clostridium ramosum*. Кроме того превышена концентрация маркеров стафилококков, энтерококков, *Eubacterium lentum* и дрожжей *Candida*.

Кроме того, выявлены некоторые частные признаки:

1. Рост численности основной группы эубактерий (*Eubacterium moniliforme*, *E.nodatum*, *E.sabureum*).
2. Частично участвуют в инфекционном процессе грамотрицательные микроорганизмы сем. *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Proteus*, *Klebsiella* и другие)
3. Реже уровень клинической значимости превышают маркеры *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Fusobacterium/Haemophilus*, *Selenomonas*, *Helicobacter pylori* и *Prevotella*.

паратов типа де-нола а также метронидазола, который, как оказалось, кроме подавления внедренных в слизистую оболочку бактериоидов стимулирует рост всех микроорганизмов нормальной микробиоты кишечника.

Мониторинг микрoэкологического статуса лиц, продолжительное время находящихся в условиях изоляции в герметически замкнутых пространствах. Доброволец принял участие в многодневном эксперименте, в ходе которого испытуемые должны были постоянно находиться в условиях герметично замкнутого пространства. Перед началом эксперимента у испытуемого был обнаружен двукратный дефицит микробиоты кишечника из-за недостатка лактобацилл, зубактерий, бифидобактерий и пропионобактерий. Вероятно, это и было настоящей причиной дерматита поясничной области тела, возникшего после чистки запыленного отсека.



В связи с этим, и учитывая связь дерматитов с состоянием микробиоты кишечника, следует проводить коррекцию таких состояний перед подобными испытаниями.

Результаты внедрения медицинской технологии суммированы в следующих ключевых публикациях:

1. Белобородова Н.В., Осипов Г.А. Гомеостаз малых молекул микробного происхождения и его роль во взаимоотношениях микроорганизмов с организмом хозяина.// Вестник РАМН, 1999, № 7, с. 25-31.
2. Кцюян Ж.А., Н.В.Белобородова, Г.А.Осипов, Н.Н.Саркисян, К.Г.Карагезян. Спектр и уровень содержания низкомолекулярных соединений микробного происхождения при периодической болезни.// Вестник РАМН, 2002, № 2, с. 41-45.
3. 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.
4. 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-спектрометрическими методами.// Эксп. Клин. Гастроэнтерология, 2003, Т. 4, № с. 59-67 .
5. 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. Здоровоохранение и медицинские технологии. 2007, № 5, стр. 20-2
6. Парфёнов А.И., Ручкина И.Н., Осипов Г.А., Калоев Ю.К. Дисбактериоз кишечника: вопросы биологической терапии.// [Журнал «Трудный пациент» / Архив / №5-2007](#)
7. 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.
8. 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.
9. Роль анаэробов в возникновении урогенитальных инфекций. Пособие для врачей. Утверждено секцией №14 Ученого Совета МЗ РФ по проблеме "Кожные болезни, заболевания, передаваемые половым путем" Протокол №3 от 9 сентября 1997 г. ЦНИКВИ, 1998, 16 с.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

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. Luckey T.D. Overview of gastrointestinal microecology.// *Nahrung*, 1987, Vol. 31, № 5-6, p. 359-364.
5. 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.
6. Вейант Р., Мосс У., Холлис Д., Джордан Дж., Кук Э., Дейншвар М. Определитель нетривиальных патогенных грамотрицательных бактерий. М. Мир, 1999, с. 612-783
7. White D.C. Validation of quantitative analysis for microbial biomass, community structure, and metabolic activity.// *Adv. Limnol.*, 1988, №31, p. 1-18.
8. Осипов Г.А. Демина А.М. Хромато-масс-спектрометрическое обнаружение микроорганизмов в анаэробных инфекционных процессах.// *Вестник РАМН*, 1996, Т.13, №2, с. 52-59.
9. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.*// Baltimore, London.- Wilians&Wilkins.- 1984.
10. Stead D.E., Sellwood J.E., Wilson J., Viney J. Evaluation of a commercial microbial identification system based on fatty acid profiles for rapid, accurate identification of plant pathogenic bacteria.// *J. Appl. Bacteriol.*, 1992, № 72, p. 315-321.
11. 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.
12. Osipov G.A., Turova E.S. Studying species composition of microbial communities with the use of gas chromatography-mass spectrometry. Microbial community of kaolin.// *FEMS Microbiol. Rev.*, 1997, Vol. 20, № 3-4, p. 437-446.
13. 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.
14. McNabb A., Shuttleworth R., Behme R., Colby W.D. Fatty acid characterization of rapidly growing pathogenic aerobic actinomycetes as a means of identification. *J. Clin. Microbiol.* 1997, Vol. 35, № 6, p.1361-1368.