Правительство Москвы
Департамент здравоохранения

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ИНФЕКЦИИ КОЖИ И СОПУТСТВУЮЩЕМ ДИСБИОЗЕ КИШЕЧНИКА ПО ХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРАМ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДА ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Учебно-методическое пособие

Москва - 2009

Согласовано
Главный терапевт
Департамента здравоохранения
Л.Б. Лазебник
_____
«____»_____2009г

Утверждаю
Руководитель Департамента
здравоохранения
Стецовский
_____
«____»_____2009г

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ИНФЕКЦИИ КОЖИ И СОПУТСТВУЮЩЕМ ДИСБИОЗЕ КИШЕЧНИКА ПО ХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРАМ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДА ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Учебно-методическое пособие

Москва - 2009

Методика определения микроорганизмов и состава кожного сала при инфекции кожи и сопутствующем дисбиозе кишечника по химическим маркерам с применением метода хромато-масс-спектрометрии

Учебно-методическое пособие. – Москва, 2009. -36 с.

Учебно-методическое пособие разработали

Ю.С. Бутов – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой дерматовенерологии ГОУ ВПО РГМУ Росздрава

А.А.Новокшенов профессор кафедры детских инфекционных болезней ГОУ ВПО РГМУ Росздрава

И.В. Полеско – кандидат медицинских наук, доцент каф дерматовенерологии и клинической микологии факульт усов врачей ГОУ ВПО РГМУ Росздрава

Г.А. Осипов – доктор биологических наук, профессор Академической группы Академика РАМН Ю.Ф.Исакова при Научном центре сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н.Бакулева

Н.Б. Бойко – младший научный сотрудник, врач-микробиолог Академической группы Академика РАМН Ю.Ф.Исакова при Научном центре сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н.Бакулева

К.В. Лядов - член-корреспондент РАМН, профессор, директор ФГУ Лечебно-реабилитационный центр Минздрава

Н.Ф. Федосова – кандидат медицинских наук, заведующая контрольно-диагностической лабораторией ФГУ Лечебно-реабилитационный центр Минздрава

Под редакцией

Рецензент

Утверждены:

Руководителем Департамента здравоохранения Стецовским

Учебно-методическое пособие подготовлено на основе результатов многолетних комплексных исследований, направленных на изучение состава микроорганизмов кожи и кожного сала, а также микробиоценоза кишечника у больных дерматитами и имеющих важное значение в поддержании гомеостаза организма человека, эффективности проводимого исследования.

Учебно-методическое пособие предназначено для терапевтов, дерматологов, гастроэнтерологов, врачей общей практики и студентов медицинских ВУЗов.

Содержание

Общая характеристика и документирование метода масс-спектрометрии микробных маркеров

I. **Введение**

II. Особенности микробной колонизации кожи

III. Описание методики ГХ-МС анализа

1. Список маркеров и их отнесение к микроорганизмам

2. Клинические материалы и средства измерений

3. Подготовка пробы к хромато-масс-спектрометрическому анализу

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

5. Интерпретация результатов. Выявление таксономически значимых жирных кислот

IV. Микробиота кишечника при дерматитах и ее нозологическая специфичность

1. Реконструкция микробиоты по данным состава микробных маркеров в крови

2. Нозологическая специфичность дисбиоза кишечника при дерматитах

V. Микробиота кожи и состав кожного сала

1. Роль дрожжеподобных грибов Malassesia в инфицировании кожи

2. Состав кожного сала и микробных маркеров кожи при дерматитах

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

1. Выбор антибиотиков и коррекция лечения

2. Применение пробиотиков и других корректоров микробиоты кишечника

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

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

Обнаруженный в результате систематических исследований гомеостаз микробных маркеров в крови и адекватность его профиля составу кишечной микрофлоры здорового человека обеспечил уникальную возможность мониторировать состояние микробиоты кишечника неинвазивным экспрессным методом – по анализу крови. Метод позволяет одновременно контролировать маркеры практически всех клинически значимых микроорганизмов – симбионтов человека. Поэтому анализ крови используется в настоящее время в ряде клиник Москвы для изучения микроэкологического статуса внутренних органов и кожи человека, обнаружения воспалений неизвестной этиологии, определения антигенов и их носителей при раневой и послеоперационной инфекции, перитоните, септических состояниях, лихорадках, заболеваниях респираторной и мочеполовой сферы.

По сравнению с традиционными методами бактериологического исследования использование хемодифференциации микроорганизмов с помощью ГХ-МС позволяет значительно сократить **время** и **стоимость** исследования, минуя стадии повторных пересевов первичных колоний и тестовых ферментаций, которые особенно сложны и трудоемки для анаэробов. Метод позволяет не только определять маркерные вещества микроорганизмов в **прямом анализе** клинического материала, выявлять и количественно определять состав микробного сообщества инфекции или изменение микроэкологического статуса организма человека, в том числе на коже, где липидные компоненты микроорганизмов замаскированы веществами кожного сала – себума. Одновременно метод ГХ-МС с капиллярными колонками высокого разрешения обеспечивает анализ 122 веществ самого себума, что расширяет информативность диагностики дерматитов.

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

- Осипов Г.А. Способ определения родового (видового) состава ассоциации микроорганизмов. //Патент РФ № 2086642. C12N 1/00, 1/20, C12Q 1 /4. Приоритет от 24 дек.1993г

- Осипов Г.А. Шабанова Е.А. Недорезова Т.П. Истратов В.Г. Сергеева Т.И. Способ диагностики клостридиальной анаэробной газовой инфекции. Патент РФ №2021608 кл.G01N 33/50.- Зарегистрировано в гос.реестре 15.10.94.- Бюл.№19.
- Осипов Г.А., Белобородова Н.В. Патент на изобретение № 2146368 «Способ выявления возбудителя инфекционного процесса в стерильных биологических средах макроорганизма», Патент зарегистрирован в Госреестре изобретений РФ 10.03 2000 г

Развитие клинических приложений метода МСММ приведено в пособиях для врачей:

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

I. Введение

Применяемые на сегодняшний день в клинической практике методы диагностики инфекции имеют определенные ограничения и недостатки. Например, существенным недостатком классического бактериологического исследования, помимо дороговизны и длительности (7-10 дней), является невозможность оценить роль некультивируемых микроорганизмов в инфекционно-воспалительном процессе, прежде всего – анаэробов. Используемый в качестве дополнительного к классическому и**ммуно-серологический метод** является непрямым - определяется не возбудитель, а иммунный ответ на него, который может иметь индивидуальные вариации. Известные молекулярно-биологические методы (ПЦР, гибридизация РНК и ДНК), при несомненных преимуществах - прямое определение возбудителя, высокие специфичность и чувствительность, универсальность, скорость, возможность диагностики хронических и латентных инфекций – имеют такие серьезные недостатки, как частые ложно-положительные результаты и невозможность адекватной количественной оценки. [1-3] Persing, 1991; Fenollar, 2006; Михайлова, 2008 .

Из всего вышесказанного вытекает востребованность в надежном экспрессном методе диагностики возбудителей инфекции. Предлагаемый метод газовой хроматографии масс-спектрометрии (ГХ-МС) позволяет детектировать в исследуемых образцах маркеры – компоненты микробной клетки – широкого спектра микроорганизмов собственной и инородной микробиоты человека. Метод является высокочувствительным, экспрессным (2,5 часа на полный цикл исследования), универсальным, экономичным и имеет широкий диагностический спектр. Он легко поддается стандартизации, для его реализации используются доступные любым лабораториям химические реактивы и методики пробоподготовки. Метод автоматизирован, что обуславливает простоту лабораторной диагностики. Предлагаемый метод ГХ-МС обеспечивает возможность при проведении анализа одного образца одновременного детектирования десятков маркеров микроорганизмов и 122 вещества из состава ЖК, стеринов и спиртов кожного сала. Диагностические возможности метода для выявления маркеров в клинических материалах представляются перспективными.

II. Особенности микробной колонизации кожи

Увеличение распространенности себореи и акне, их значительное влияние на психо-эмоциональную сферу, социальный статус и общественную адаптацию больных

обуславливают актуальность данной проблемы и необходимость дальнейшего изучения патофизиологических механизмов развития этих дерматозов, что может помочь в создании более эффективных препаратов для его лечения. Ключевыми факторами в сложном процессе патогенеза себореи и акне являются: возрастание активности сальных желез, фолликулярный гиперкератоз, бактериальная колонизация, воспаление и иммунный ответ. Имеются данные, что дисбиоз кишечника играет немаловажную роль в развитии кожных заболеваний. Изменение качественного состава кожного сала приводит к значительному нарушению барьерной функции эпителия, что создает условия для роста микроорганизмов на поверхности кожи и внутри фолликулов.

Себорейный дерматит (себорея) характеризуется эриматематозными, экзематозными пятнами на желтоватой, сальной коже и представляет собой хроническое заболевание кожи, локализованное в областях с высокой концентрацией сальных желез Burkhart, 2003 (4,5). Поражая примерно 3-5% населения, преимущественно мужчин, это заболевание превалирует среди подростков и молодых людей. Его можно рассматривать как спектр заболеваний от умеренной перхоти с одной стороны и тяжелой себореи - с другой.

Вульгарные угри (ВУ), или акне – хроническое плейоморфное полиэтиологическое заболевание волосяных фолликулов и сальных желез. Несмотря на имеющиеся эффективные средства лечения акне, за последние 10 лет отмечен рост заболеваемости, как среди подростков, так и среди взрослого населения. Данное заболевание поражает до 95 % лиц юношеского возраста и более 50 % лиц старше 25 лет. Кроме того, увеличилась и частота персистирующих форм болезни (6,7,8) Cordain, 2002; Daniel,2000; Healy, 1994.

Важными факторами патогенеза как себореи, так и угревой болезни являются повышение продукции сальными железами кожного сала измененного химического состава, нарушение пролиферации и дифференцировки кератиноцитов, а также микробная колонизация сально-волосяных фолликулов (9,10,11,12) Woodard, 2002; Адаскевич, 2003; Аравийская, 1998; Данилова, 2001. Как видно, оба заболевания этиологически близки, что создает концептуальную перспективу их совместного рассмотрения и использования групп пациентов как групп сравнения.

Считается, что основными группами микроорганизмов здоровой кожи, являются пропионовые бактерии, стафилококки и дрожжи рода *Malassezia* (4, 13) Burkhart, 2003; Till, 2000. Чаще всего в связи с себореей и акне упоминаются *P.acnes*, хотя данные об этиологической роли этих микроорганизмов в их развитии противоречивы: не всегда отмечают корреляцию частоты встречаемости и обсемененности с наличием заболевания (14,15,16) Eady, 1998; Neubert, 1988; Noble, 1993. Очевидна необходимость периодического

мониторирования микробного пейзажа в группах больных и клинически здоровых людей с применением современных диагностических методов.

Изучение колонизации кожи анаэробами показало наиболее частое обнаружение видов Peptostreptococcus, особенно P. magnus и P. assaccharolyticus, а также Bacteroides fragilis (17) Higaki, 2003.

P.acnes обитают внутри пилосебацейной ячейки в составе биопленки. Иначе говоря, они живут в сообществе бактерий, окруженных экстраклеточной полисахаридной оболочкой, которую микроорганизмы образуют после прикрепления к поверхности. Этот гликокаликсный полимер действует в качестве экзоскелета и создает физический барьер, снижающий концентрацию антибиотиков внутри компартмента. Представление сообщества микроорганизмов в качестве биопленки позволяет объяснить как их иммуногенность, так и особенности клинического проявления заболевания. Модель биопленки P.acnes объясняет многие аспекты патогенеза и терапии акне: например – почему необходимо продолжительное лечение антибиотиками, почему предварительная оценка чувствительности к антибиотикам не является гарантией излечения. Учет принципов существования микроорганизмов в виде биопленки в применении к акне предлагает новые пути практических подходов в лечении этого заболевания (4) Burkhart, 2003. Отмечается, что в инфицировании кожи участвует смешанное аэробно-анаэробное микробное сообщество (18) Brook, 2002. Кроме того, давно подозревается, но редко подтверждается связь кожных заболеваний с состоянием микробиоты кишечника. По сравнению со здоровыми новорожденными младенцы с аллергией имели на три порядка выше колонизацию толстого кишечника клостридиями и втрое выше уровень содержания стафилококков. При этом обнаруживалось замедление темпов колонизации кишечника энтерококками и бифидобактериями (19) Bjorksten, 2001. По данным другого исследования (114 пациентов с вульгарными угрями) культуральным методом у 61 (54%) обнаружен дисбактериоз первого (21%) или второго (78,7%) типа. Найдено, что коррекция дисбиоза в сочетании с традиционной терапией вдвое сокращает период лечения (20) Волкова, 2001.

В связи с вышеизложенным представляется актуальным проведение комплексного исследования состояния секреции кожного сала, колонизации кожи больных и состояния микробиоценоза кишечника у больных этиологически близкими заболеваниями кожи - себореей и акне. Использование молекулярного метода масс-спектрометрии микробных маркеров дает перспективу получения более полного и точного представления о составе и динамике изменения микробиоты и себума кожи за счет включения некультивируемых в условиях лабораторий клинической микробиологии микроорганизмов и широкого спектра липидных веществ кожного сала в норме, патологии и в процессе лечения. Метод масс-спектрометрии, в отличие от применяемого в обычной практике посева фекалий на

культуральные среды, позволяет получить информацию действительно о микробиоте кишечной стенки, с участием которой проходят реальные физиологические процессы, в том числе – продукция химических веществ, имеющих мишенью клетки кожи. Для получения такой информации достаточно анализа микробных маркеров в крови пациентов, поскольку показано, что их состав преимущественно адекватен составу пристеночной микробиоты тощей кишки (21) Осипов, 2003.

Методы микробиологии, связанные с необходимостью выращивания живых микроорганизмов, мало пригодны (если не сказать, - не пригодны) для достоверного анализа микрофлоры кожи в мазках или смывах с ее поверхности. «На кожных покровах микроорганизмы подвержены действию бактерицидных факторов сального секрета, повышающих кислотность. В подобных условиях живут преимущественно Staphylococcus epidermidis, микрококки, сарцины, аэробные и анаэробные дифтероиды. ….. Основные зоны колонизации – эпидермис (особенно роговой слой), кожные железы (сальные и потовые) и верхние отделы волосяных фолликулов…… Обычно на 1 см^2 выявляют 10^3-10^4 микроорганизмов; на участках с повышенной влажностью их число может достигать 10^6 .» (22) Поздеев, 2001. В другом источнике сообщается, что видовой состав кожи включает более 300 видов анаэробных и аэробных бактерий (для сравнения - в кишечнике – около 500). «Они присутствуют преимущественно в толще эпителия, сальных железах, воронкообразных расширениях волосяных фолликулов». При этом «Значительная плотность микробных популяций отмечена в области лба и волосистой части головы (до 10^6-10^7 КОЕ/см^2)» (23) Шендеров, 1998. Если сравнить эти оценки с данными 10^9 – 10^{10} / см^2 (16) Noble, 1993, то приходится признать, что культуральный метод выявляет менее тысячной доли кожных микробов. Поскольку масс-спектрометрия опирается на анализ молекулярных микробных маркеров микроорганизмов, для которых кожное сало является нейтральной транспортной средой, то ее данные следует считать наиболее близкими к реальным как по видовому составу, так и количеству клеток каждого вида. Последнее определено по порядку величины с использованием внутреннего инварианта биологических жидкостей человека и животных – маргариновой кислоты, содержание которой известно и составляет 1-1,5 % от суммы жирных кислот. Определенная таким образом численность микроорганизмов кожи составляет 10^9 – 10^{10} / мл, что в точности соответствует оценке Нобла. Поэтому масс-спектрометрический метод следует считать оптимальным для сопоставительных оценок изменения состава микрофлоры при патологических состояний и эффекта лечения.

III. Описание метода

1. Список маркеров и их отнесение к микроорганизмам

Известно, что состав жирных кислот микроорганизмов видоспецифичен и используется для их идентификации в чистой культуре [24, 25, 26] Митрука, 1978; Chemical Methods,1985; Stead, 1992. Кроме того, у многих микробов имеются индивидуальные маркеры специфичные для таксонов разного уровня (семейства, рода или вида), по которым их можно определять количественно в объектах окружающей среды и клинических пробах [27-32] Турова, 1996; Osipov, 1997; Осипов, 1996; Белобородова, 1999, Кцоян,2002. Суть анализа состоит в прямом извлечении с помощью химической процедуры высших жирных кислот из подлежащего исследованию образца, их разделения на хроматографе в капиллярной колонке высокого разрешения и анализа состава в динамическом режиме на масс-спектрометре. Поскольку хроматограф соединен в едином приборе с масс-спектрометром и снабжен компьютером с соответствующими программами автоматического анализа и обработки данных, сам процесс анализа занимает 30 мин, а с учетом времени пробоподготовки и расчета данных - не более 2,5 часов. Его результатом является количественное определение состава микроорганизмов и кожного сала.

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

Таблица 1

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

№	Обозначение*	Название	Микроорганизмы
1.	C10	декановая	*Streptococcus, Rhodococcus terrae*
2.	iC10	изодекановая	
3.	i11		р. *Xanthomonas, p. Flexispira – 16%*
4.	C12:0	лауриновая	большинство видов микроорганизмов, р. *Arcobacter, p.Flexibacter - 16%*

5.	C12:1	додеценовая	р. *Rhodobacter*
6.	iC12	изолауриновая	*Peptostreptococcus anaerobius*
7.	iC13	изотридекановая	*Bacteroides, Butyrivibrio, Riemerella, Stenotrophomonas maltophilia, Bacillus subtilis, Brtvibacterium (13%)*
8.	a13	антеизотридекановая	*Bacillus cereus, Brevibacterium*
9.	13:0	тридекановая	*р. Selenomonas (oral)*
10.	i14	изомиристиновая	рр. *Streptomyces, Bacillus, Bacteroides, Legionella, Kurthia, Peptostreptococcus anaerobius, актинобактерии, Eubacterim leutum*
11.	14:1Δ9	9,10- тетрадеценовая	рр. *Sphaerotilus, Clostridium, Streptococcus pneumoniae*
12.	a14:1		*Curtobacterium psychrophilum*
13.	14:1Δ11	11,12-тетрадеценовая	*Acetobacterium, Simonsiella, Kingella kingae, Nocardia, гомоацетатные*
14.	14:0	миристиновая	рр. *Lactobacillus, Helicobacter, Campylobacter, Streptococcus, Clostridium, Gilardy*
15.	2Me14		*Mycobacterium gordonae-2-12%*
16.	i15:1	изопентадеценовая	рр. *Desulfovibrio, Flavobacterium*
17.	15:1Δ9	9,10-пентадеценовая	рр. *Halobacteroides, Haloincola, Cytophaga -7,4 %, Stigmatella -3,5 %, Selenomonas-7-13 %, Desulfotomaculum, Cl. putrefaciens, Cl. sporogenes,* ***Cl. propionicum,*** *Bacteroides hypermegas*
18.	i15	изопентадекановая	многие виды микроорганизмов DF3-like р.*Riemerella, Flavobacterium breve,Propionibacterium, Bacteroides*
19.	a15	антеизопентадекановая	многие виды микроорганизмов, Azotobacter – 80%, Staphylococcus, Bacillus, коринеформные
20.	15cyc	циклопентадекановая	
21.	15:0	пентадекановая.	большинство видов микроорганизмов, минорный компонент рр. *Desulfobulbus, Cytophaga-16 %, Selenomonas-28 %, Cl. sporogenes, Bacteroides succinogenes, Bact. ruminicola -25-30 %* , Pseud. stutzeri 23%
22.	15:1Δ11	11,12-пентадекановая	
23.	i16:1	изогексадеценовая	р. *Desulfovibrio*
24.	16:1Δ7	7,8-гексадеценовая	***Methylomonadaceae***, р. *Deinococcus, Desulfotomaculum acetoxidans, Caulobacter vibrioides, Clostridium ramosum*, метаногены
25.	16:1Δ9	9,10-гексадеценовая	большинство видов микроорганизмов

26.	16:1Δ11	11,12-гексадеценовая	pp. *Bdellovibrio, Vibrio, Nocardia, Ruminococcus, Rhodococcus rhodochrous, Bacteroides amylophilus, Sporocytophaga myxococcoides(oral), Desulfobacterium, Sphingomonas capsulata*
27.	i16:0	изопальмитиновая	***Streptomyces***, *Nocardiopsis, Bacillus (термофилы), Bacteroides, Micromonospora, Brevibacterium, Corynebacterium* гр. *betae, Curtobacterium, Oerskovia, Cellulomonas, Arthrobacter simplex*
28.	10Me16	10-метил-гексадекановая	р. *Desulfobacter, Rhodococcus, актиномицеты*
29.	16:0	пальмитиновая	большинство видов микроорганизмов
30.	i17:1	изопентадеценовая	(Актиномицеты), *Desulfovibrio, Flavobacterium, Desulfohalobium redbaense, Micromonospora*
31.	17:1	гептадеценовая	*Mycobacterium, Nocardiopsis, Clostridium, Candida albicans, Moraxella, Acetobacter putrefacience,*
32.	i17:0	изогептадекановая	*Bacillus, Propionibacterium, Prevotella*
33.	a17:0	антеизогептадекановая	*Corynebacterium, Bacteroides, Nocardiopsis, Nocardia, Micromonospora*
34.	17cyc	циклогептадекановая	сем. *Enterobacteriaceae*, pp. *Pseudomonas, Desulfobacter, Caulobacter* , OFBA - 1, *Alcaligenes, Bordetella, Afipia, Comamonas h10*
35.	17:0	гептадекановая	большинство видов микроорганизмов, минорный компонент
	10Me17		*Verrucosispora gifhorhensis(морф)*
36.	17chex	ω-циклогексил-ундекановая	р. *Sulfobacillus, Bacillus acidocaldarius*
37.	a17:1	антеизогептадеценовая	р. *Desulfotomaculum, Desulfovibrio*
38.	18:4	октадекатетраеновая	некоторые грибы и дрожжи
39.	18:3	ланоленовая	грибы и дрожжи
40.	18:2	линолевая	грибы, дрожжи, простейшие
41.	18:1Δ9	олеиновая	все организмы
	i18:1 H		*Enterococcus faecalis, Fi., Str*
42.	18:1Δ11	цис-вакценовая	сем. *Enterobacteriaceae*, pp.*Nitrobacter, Bdellovibrio, Lactobacillus, Streptococcus, Succinivibrio, Campylobacter, Fusobactrium, Pseudomonas; Brucella, Achromobacter, Cardiobacterium hominis*
43.	18:0	стеариновая	
44.	i18	изооктадекановая	*pp. Peptostreptococcus, Bifidobacterium, Nocardiopsis, Bacillus subtilis, Clostridium difficile*
45.	10Me18	10-метил-октадекановая	р. *Mycobacterium, Nocardia; Corynebacterium bovis, C.*гр. *xerosis, C.urealyticum,*

		(туберкулостеариновая)	
46.	18:1Δ7	7,8-октадеценовая	грибы, эукариоты
47.	ω-цг19	циклогексилтридекановая	
48.	Rlt = 18,1 br.19:1 (11Me18:1)		*Afipia, Helicobacter mustelae*
49.	19cyc	Циклононадекановая OFBA (клинич) – 24%	pp. *Lactobacillus, Enterococcus, Pseudomonas, Brucella, Campylobacter,* сем. *Enterobacteriaceae, Helicobacter pylori, H. mustelae, Pediococcus cerevisiae- 40% , Afipia, гр. Campylobacter coli*
50.	i19	изононадекановая	*Bacillus subtilis, Bacteroides hypermegas*
51.	a19	антеизононадекановая	pp. *Staphylococcus, S. epidermidis Peptostreptococcus,*
52.	19:0	нонадекановая	pp. *Nitrobacter, Bacillus, Serratia; Pseudomonas cepacia*
53.	i19:1		*Afipia (кошачьи царапины)*
54.	19 chex	ω-циклогексил-тридекановая	p. *Sulfobacillus, Bacillus acidocaldarius*
55.	20:4	арахидоновая	простейшие, клетки эукариот
56.	20:1	эйкозеновая	*Propionibacterium jensenii, Actinomyces, Streptococcus thermophilus, St. salivarius, St. mutans*
57.	20:0	эйкозановая	*Actinomyces* гр. *bovis*
	20:1Δ11		*Strept. mutans – 13,9%*
58.	Копростанол	холестанол	p. *Eubacterium*
59.	21:0	бегеновая	p. *Francisella*
60.	22:6	докозагексеновая	грибы, эукариоты
61.	22:0	докозановая	p. *Francisella*
	C22:4	арахидоновая кислота	простейшие и высшие организмы
62.	24:0	тетракозановая	p. *Francisella, Mycobacterium,* микроэукариоты
	25:0	пентакозановая	микроэукариоты
63.	26:0	гексакозановая	p. *Mycobacterium* микроэукариоты
оксикислоты :			
64.	3h10** - без h12 (или мало)	оксидекановая	**Bordetella pertussis,*B.parapertussis, Pseudomonas syringae, P. alcaligenes, P. stutzeri, P. mendocina, *Comamonas*
65.	2h10	2-оксидекановая	p. *Pseudomonas*
66.	hi11	оксиизоундекановая	*Stenotrophomonas maltophilia,*
67.	2hi11	2-оксиизоундекановая	*Stenotrophomonas maltophilia,*
68.	h11	оксиундекановая	*сульфатвосстанавливающие бактерии*
69.	h12:1	оксидодеценовая	*Pseudomonas aeruginosa*
70.	3h12	оксилауриновая	*p. Acinetobacter, Pseudomonas, Vibrio; Neisseria, N. gonorrhoeae, Moraxella, Arcobacter, Eikenella, Suttonella (без 2h12),*

			Kingella, Ps.pertucinogena – h10 и h12 (без 2h12)
71.	2h12	2-оксилауриновая	*Pseudomonas putida, P.aeruginosa,* pp. *Acinetobacter, Alcaligenes (без 3h12,но с 3h14), Bordetella (avium, holuopii + 2,3H14)*
72.	hi13	оксиизотридекановая	*Stenotrophomonas maltophilia,*
73.	3h13	окситридекановая	p. *Selenomonas; Bacteroides hypermegas,*
74.	hi14:1	оксиизотетрадеценовая	
75.	h14:1	окситетрадеценовая	
76.	hi14	оксиизомиристиновая	
77.	3h14	оксимиристиновая	pp. *Bordetella, Alcaligenes, Fusobacteriun, Haemophilus, Vibrio, Wolinella, Campylobacter, Neisseria, сем. Enterobacteriaceae*
78.	2h14	2-оксимиристиновая	*Alcaligenes, Burkholderia cepacia, Bordetella (групп 1, 1vc 2), Sphingomonas capsulata, Salmonella*
79.	2hi14	2-оксиизомиристиновая	
80.	2,3hi14	2,3-диокси-изотетрадекановая	p. *Legionella*
81.	3h15	оксипентадекановая	*Bacteroides ruminicola*
82.	2h15	2-оксипентадекановая	*Sphingomonas adhaesiva*
83.	3hi15	оксиизопентадекановая	pp. *Flavobacterium, Capnocytophaga; Bacteroides melaninogenicus, Prevotella, Weeksella*
84.	2hi15	2-оксиизопентадекановая	pp. *Flavobacterium, Flexibacter, Weeksella*
85.	3ha15	оксиантеизопента-декановая	*Bacteroides ruminicola*
86.	h16	оксипальмитиновая	pp. *Erwinia, Brucella, Bacteroides, Wolinella, Cytophaga, Flexibacter, Fusobacterium, Bordetella; Burkholderia cepacia, P. pseudomallei, Campylobacter fetus, C. sputorum, C. fecalis,*
87.	h16:1	оксигексадеценовая	
88.	2h16	2-оксипальмитиновая	p. *Flexibacter; Alcaligenes, Burkholderia cepacia, P. pickettii (2h16:1),* клетки эпителия, спермий и другие эукариотические клетки
89.	hi16	оксиизопальмитиновая	
90.	2hi16	2-оксиизопальмитиновая	*Streptosporangium*
91.	3hi17	оксиизогептадекановая	pp. *Bacteroides, Flavobacterium, Cytophaga, Flexibacter, Riemerella*
92.	2hi17	2-оксиизогептадекановая	p. *Flexibacter*
93.	3h17	оксигептадекановая	*Bacteroides ruminicola, B. thetaiotaomicron*
94.	3ha17	оксиантеизогепта-декановая	*Bacteroides ruminicola*

95.	10h18:1	10-оксиоктадеценовая	*Clostridium perfringens*
96.	h18	оксистеариновая	pp. *Francisella (F. philomiragia), Brucella, Achromobacter, Helicobacter pylori,*
97.	2h18	2-оксистеариновая	эукариоты (сфинголипид простейших)
98.	10h18	10- оксистеариновая	*Clostridium perfringens*
99.	hi18	оксиизооктадекановая	p. *Aquaspirillum*
100.	9,10 epoxy18	9,10-эпоксиоктадекановая	*Pneumocistis carinii*
101.	3h20	оксиэйкозановая	*Chlamydia trachomatis*
102.	3hi20	окси-изо-эйкозановая	*Chlamydia trachomatis, Legionella*
103.	2h20	2-оксиэйкозановая	клетки эукариотов
104.	3h22	3-оксидокозаиновая	*Chlamydia trachomatis*
105.	2h22	2-оксидокозановая	клетки эукариотов
106.	2h24	2-окситетракозановая	клетки эукариотов
107.	2h26	2-оксигексакозановая	клетки эукариотов
Спирты:			
108.	16alc	n-пальмитиновый	p. *Moraxella*
109.	18alc, 2-OH h18 alc	стеариновый, 2-OH	p. *Mycobacterium MAIS,* n18 – *Moraxella* *Micromonospora*
110.	20alc	n-эйкозиловый	*Mycobacteria*
111.	2h20alc	2-оксиэйкозиловый	*Mycobacterium tuberculosis*
112.	22alc	n-докозиловый	
113.	2h22alc	2-оксидокозиловый	*Mycobacterium xenopii*
	2h24alc	2-окситетракозиловый	*Mycobacteria*
	2h26alc	2-оксигексакозиловый	*Mycobacteria*
Альдегиды :			
114.	12a	лауриновый	p. *Butyrivibrio*
115.	13a	тридекановый	p. *Butyrivibrio, Selenomonas*
116.	i14a	изомиристиновый	pp. *Bifidobacterium, Butirivibrio*
117.	14:1Δ9a	9,11-тетрадеценовый	p. *Butyrivibrio,* *Clostridium fimetarum*
118.	14:1Δ11a	11,12-тетрадеценовый	p. *Butyrivibrio,* *Clostridium fimetarum*
119.	14a	тетрадекановый	pp. *Butyrivibrio, Bifidobacterium, Spirochaeta,*
120.	i15a	изопентадекановый	pp. *Butyrivibrio, Lactobacillus (rumen), Propionibacterium*
121.	a15a	антеизопентадекановый	p. *Butyrivibrio, Eubacterium, Frigoribacterium, Propionibacterium freudenreichii*
122.	15:1a	пентадеценовый	p. *Butyrivibrio*
123.	15a	пентадекановый	p. *Butyrivibrio*
124.	16:1Δ9a	9,10-гексадеценовая	p. *Butyrivibrio, Selenomonas, Lactobacillus, Eubacterium, Mobiluncus, Peptostreptococcus anaerobius*
125.	16:1Δ11a	11,12- гексадеценовый	*Clostridium fimetarum*
126.	16a	пальмитиновый	*C. fallax,* pp. *Lachnospira, Butyrivibrio, Lactobacillus*
127.	i17a	изогептадекановый	*Propionibacterium freudenreichii*
128.	a17a	антеизогептадекановый	*Eubacterium, Propionibacterium freudenreichii*

129.	17cyca	циклогептадекановый	*Clostridium bejerinckii*
130.	17a	гептадекановый	*Lactobacillus (rumen)*
131.	i18a	изостеариновый	pp. *Eubacterium, Lachnospira, Butyrivibrio, Bifidobacterium, Selenomonas, Mobiluncus, Clostridium butiricum*
132.	18:1a	октадеценовый	***Eubacterium***, *Clostridium*
133.	18a	стеариновый	*Clostridium thermocellum*
134.	a16a	антеизопальмитиновый	*Clostridiun acetobutilicum, Cl. butiricum*
135.	19cyca	циклононадекановый	p. *Lactobacillus*
136.	19a	нонадекановый	*Clostridium turobutiricum*
137.	17:1a	гептадеценовый	
Стерины:			
138.		копростанол - холестанол	*Eubacterium*
139.		холестендиол	простой герпес
140.		холостадиенон	цитомегаловирус
141.		Pneumocysterol	*Pneumocystis carini, P. hominis*
142.		campesterol	микроскопические грибы
143.		эргостерол	*Aspergillus +like fungi*
144.		ситостерол, β-ситостерол	микроскопические грибы, растения
145.		холестерин	простейшие и высшие организмы
146.		фитанилглицерины, дифитанилглицерины	метаногены, архебактерии
147.		гопаны	цианобактерии, архебактерии
148.		стераны	метанотрофы
149.			

* - Обозначения веществ: 17:1 - 17- число атомов углерода, цифра после двоеточия - число двойных связей; h - оксикислота; a,i - в начале означает разветвление; cyc - циклопропановая кислота. Например, ha17 - 3-окси-антеизогептадекановая кислота.
**- имеется в виду 3-оксикислоты, если не указано положение гидроксила

ГХ-МС-анализу присущи:

- **широкий диагностический спектр**: определение маркеров десятков микроорганизмов одновременно в одном анализе;
- **универсальность**: определение разных групп микроорганизмов: бактерий, грибов, вирусов;
- **экспрессность**: время одного анализа не более 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 + база данных.

Показанием к применению ГХ-МС метода является определение общего микроэкологического статуса организма и кожи, его отклонений от гомеостаза, а также установление или уточнение этиологии инфекционно-воспалительного процесса при любых нозологических формах заболеваний в клинической практике. Метод может, при необходимости, быть использован для анализа микробной этиологии сопутствующих дерматитам заболеваний других органов.

Противопоказаний к применению метода ГХ-МС **нет**.

2. Клинические материалы и средства измерений

Материалом для исследования больных с заболеваниями кожи служат кровь, соскобы кожи, мазки себума (поверхности кожи), биоптаты кожного эпителия, экссудаты себума и кожи из надрезов - в зависимости от конкретно решаемой задачи.

Для реализации метода использовались следующее оборудование и реактивы (табл 2)

Таблица 2

Оборудование и реактивы для осуществления анализа по методу масс-спектрометрии микробных маркеров

Оборудование	Фирма	Страна	№ в госреестре
Хромато-масс-спектрометр AT 5973 (газовый хроматограф с масс-селективным детектором серийного выпуска	Agilent Technologies Inc.	США	ГОСТ Р 50460-92
Микрошприц Hamilton 10 мкл, точность дозирования 0,2 мкл.	Agilent Technologies Inc.	США	ГОСТ Р 50460-92
Драй блок термостат /до 100^0/ TDB-U-400	Biosan	Латвия	ТУ TN LV 000307246-03-98
Центрифуга лабораторная медицинская ОПн-8 (можно заменять на аналог по техническим параметрам)	АО ТНК "Дастан"	Киргизия	ТУ5.375-4261-76
Система интенсивного встряхивания «Vortex» V-1 plus, или аналогичная	Biosan	Латвия	ТУ TN LV 000307246-02-98
Микропипетки переменного объема (100-1000 мкл) автоматические или набор пипеток постоянного объема	ОАО «Ленпипет»	РФ	Рег.удостоверение МЗ РФ №2001/978

на 20, 40, 100, 200 и 1000 мкл.			
Метанол			ГОСТ 6995-77
Гексан			ТУ 6-09-3375-78.
Триметилсилилтрифторацетамид (или аналогичный другой фирмы)	фирма «Supelco» или иная	США	№33027 Лот LB15973
Стеклянные флаконы объемом 1,5мл с завинчивающимися крышками, снабженными тефлонированными резиновыми прокладками	«Hewlett-Packard»,	США.	ГОСТ Р 50460-92

Методика отработана на хромато-масс-спектрометрах AT 5973(75) фирмы Agilent Technologies, США, и аналогичных приборах фирм Вариан (Polaris, DSQ-II) (США-Россия), Shimadzu (Япония) и Micromass (Великобритания) состоящих из собственно масс-спектрометра, соединенного с ним хроматографа, системы вакуумной откачки и ЭВМ с периферийными устройствами. Для реализации метода принципиально необходимо, чтобы ГХ-МС система обеспечивала работу в режиме селективных ионов (синонимы масс-фрагментография, Single Ion Monioring).

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 который можно использовать на PC с операционной системой Windows 2000 или XP, NT.

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

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

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

Образцы биологической жидкости или ткани обрабатывают сразу или замораживают при - 5/ -18 ^{o}C при невозможности немедленного анализа. Допускается транспортировка проб при нормальной температуре в течение пяти часов. Допускается длительное хранение в высушенном виде (высушивать при температуре 70-85°C) при необходимости дальней транспортировки или пересылки пробы по почте.

Кровь из пальца (можно из вены) в количестве не менее 100 мкл отбирают в пробирку с гепарином или ЭДТА (цитрат не рекомендуется) и помещают в холодильник. Для анализа цельную кровь в количестве 40мкл пипеткой переносят в виал, емкостью 1,5 мл, с

завинчивающейся крышкой, имеющей тефлонированную прокладку, подсушивают (при снятой крышке) в термостате при 80^0С с добавлением 40мкл 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 80^0С в течение 1 часа. К охлажденной реакционной среде добавляют 300 нг стандарта (дейтерометиловый эфир тридекановой кислоты) в виде заранее приготовленного раствора в гексане. Затем проводят экстракцию двумя порциями по 200 мкл гексана при встряхивании на вибраторе типа Vortex и выстаивании в течение 5 мин при комнатной температуре. Объединенный экстракт переносят в чистый виал, высушивают 5-7 мин при 80°С и обрабатывают 20 мкл N,O-бис(триметилсилил)-трифторацетамида, в течение 15 мин при 80°С при закрытой крышке. К реакционной смеси добавляют 80 мкл гексана и, при анализе с использованием автосемплера, переносят смесь в коническую вставку, которую помещают в 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.

Биоптаты тканей.

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

Микробиота кожи

Транспортной средой микроорганизмов, обитающих в порах и органеллах кожи является кожное сало – себум. Его отбирают ватным тампоном на штоке, использующимся 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 $см^2$ в месте поражения (дерматита). Для анализа пинцетом с крючками снимают головку тампона и переносят в виал для кислого метанолиза, как в случаях, описанных выше. Для контроля артефактов анализируют отдельно вату тампона в холостом опыте. ГХ-МС анализ проводят по тому же методу масс-фрагментографии с добавлением в программу сканирования ионов с массой 103, характерных для гомологического ряда триметилсилильных производных жирных спиртов и иона 129, общего для ряда целевых стеролов. Отличалась от прежней методика обработки

данных. Разнообразие жирных кислот и спиртов кожного сала потребовало включение в список автоматически детектируемых новых веществ, расширив его от шестидесяти (для микробных липидов) до 127. Включены уникальные для себума разветвленные и ненасыщенные ЖК и спирты с длиной цепи от 10 до 30 атомов углерода. При обработке данных в программе EXCEL автоматически суммировали количество спиртов, жирных кислот и стеролов, а затем соотношение спиртов и стеролов, которое использовали в качестве меры соотношения экзогенных и эндогенных липидов кожи, имеющего общепринятое диагностическое значение при лечении акне. Для сопоставления проб и мониторинга лечения использовали профиль деципроцентного состава проб – долю веществ от их суммы, нормированной на 1000 (а не на 100, как в обычных процентах). Для идентификации веществ хроматограммы проводили отдельные анализы при прямом сканировании проб по полному масс-спектру с последующим библиотечным поиском в штатных базах данных прибора (NIST98.L и WILEY275.L).

Смесевую фракцию крови и кожного сала при сечении эпителия кожи головы снимают на фильтровальную бумагу, пропитывая примерно 1см^2 ее поверхности. Фильтровальную бумагу предварительно промывают в обезжиривающем растворителе (эфире, ацетоне, хророформе, спирте) и высушивают. Пятно пробы высушивают при температуре не выше 100°С, вырезают по контуру ножницами и помещают в виалу. Обрабатывают далее как кровь после высушивания.

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

Для проведения анализа смесь эфиров в количестве 2 мкл вводят в инжектор ГХ-МС системы АТ-5973 Аджилент технолоджис (США) вручную или посредством автоматической системы ввода проб (автосэмплер), которая обеспечивает воспроизводимость времен удерживания хроматографических пиков и повышает точность автоматической обработки данных. Анализ проводят методом мультиионнной масс-фрагментографии, контролируя в определенной последовательности по автоматической программе 33 характерных иона из масс-спектров жирных кислот, специфических для микроорганизмов.

Хроматографическое разделение пробы осуществляют на капиллярной колонке с метилсиликоновой привитой фазой HP-5ms Аджилент технолоджис длиной 25м и внутренним диаметром 0.25мм. Режим анализа - программированный, скорость нагрева термостата колонки 7 град/мин в диапазоне 135 - 320°С. Выдержка при начальной температуре 1,5 мин. Масс-спектрометр - квадрупольный, с ионизацией электронами (70эв) 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 систематизировано распределение ионов по группам в программе ГХ-МС анализа микробных маркеров в образцах биологических жидкостей и тканей человека с указанием детектируемых маркеров и соответствующих им микроорганизмов.

Таблица 3: Группы сканируемых ионов, маркеров и соответствующих микроорганизмов

Группа.	Начало, мин	Ионы	Вещества	Микроорганизмы
1	3.0 перед C10	87.1	общий ЖК от C10- до C16:Δ11	*Clostridium, Bacillus, Peptostreptococcus spp. , Ruminococcus, Nocardia asteroides*
		175.2	3h (общий)	*Neisseria spp., Acinetobacter*
		259.2	h10 (M-15)	*Pseudomonas spp.*
		287.3	h12 (M-15)	*Pseudomonas , Neisseria, Moraxella spp*
		243.3	2h12	*P.aeruginosa, Acinetobacter*
		241,2	i,a15a	*Butyrivibrio spp*
		270.3	i16	*Streptomyces spp.*
		301,2	hi13, H13	*Stenotrophomonas, Selenomonas*
		75.1	Жирные альдегиды	*Propionibacterium, Eubacterium spp,*
		90,1	$C13CD_3$	Дейтеротридекановая кислота, внутренний стандарт
		103,1	Жирные спирты	Компоненты кожного сала
		186.2	10:0	*Streptococcus (оральные)*
2	12.3 после C16:1	271.2	2h14	*Alcaligenes*
		175.2	3h, общий	*Fusobacterum, сем.Enterobacteriaceae*
		315.3	h14 M	*Fusobacterium, Haemophylus Enterobacteriaceae*
		103.1		Компоненты кожного сала
		75.1	Жирные альдегиды	*Eubacterium lentum*
		253.2	i16a	*Eubacterium lentum*
3	12.8	87.1	i,a,n17:0; 10Me16; 18:1 Δ11	Коринеформы *CDC, Propionibacterium, Rhodococcus sp, Lactobacillus*

	После 3h14	285.2	2h (общий), 2hi15	*Flavobacterium spp.*
		250.2	17cyc, i17:1 и 17:1	*Enterobacteriaceae, Candida, Campylobacter spp.*
		298.3	i18	*Clostridium difficile*
		175.2	3h общий	*Prevotella spp.*
		75.1	Жирные альдегиды	*Eubacterium spp., P. freudenreichii*
4	15.0 после 18:1Δ11	273.3	10h18, 10h16	*C. perfringens, Malassesia*
		87.1	ЖК (общий)	*Staphylococcus, Actinomyces, Streptococcus mutans*
		75.1	Жирные альдегиды	*Bifidobacterium, Enterococcus spp.*
		281.3	Δ9, Δ11-18:1a	*Eubacterium, Bifidobacterium*
		399.3	hi20, h20	*Chlamidia trachomatis*
		427,3	h22	*Chlamidia trachomatis*
		175.1	3h16, 3h18	*Prevotella, Bacteroides spp., Helicobacter pylori, Burkholderia*
		312.3	i,a,n19:0	*Staphylococcus, Mycobacteria spp.*
		278.2	19cyc, 19:1; 11Me18:1	*Enterococcus sp* *Afipia, Helicobacter mustelae*
		199.2	10Me18	*Mycobacteria, Corinebacterium spp.*
		383.3	2h22	Микроскопические грибы
		117	2h20alk	*Mycobacterium tuberculosis*
5	23.0 после h22	411,3	2h24	Микроскопические грибы
		370.3	Копростанол	*Eubacterium spp.*
		456.3	холестендиол	Herpes
		382.3	холестадиенон	Цитомегаловирус
		363.3	Эргостерол	Микроскопические грибы
		343.3	Кампестерол	Микроскопические грибы
		472.3	Метилхолестанол	Herpes
		396.3	β-ситостерол	Микроскопические грибы

Комментарий: **интервалы сканирования** устанавливают по группам ионов следующим образом**:**

- 1 группа, начало - за 0,5 минут до выхода декановой кослоты, окончание -промежуток между C16:1 и C16:0
- 2 группа - началом является время окончания 1-й группы, окончание - перед туберкулопальмитиновой кислотой (10Me16) - это 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 померять цис-вакценовую кислоту (18:1Δ11)
- 4 группа - окончание 3-й и 1мин 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.

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

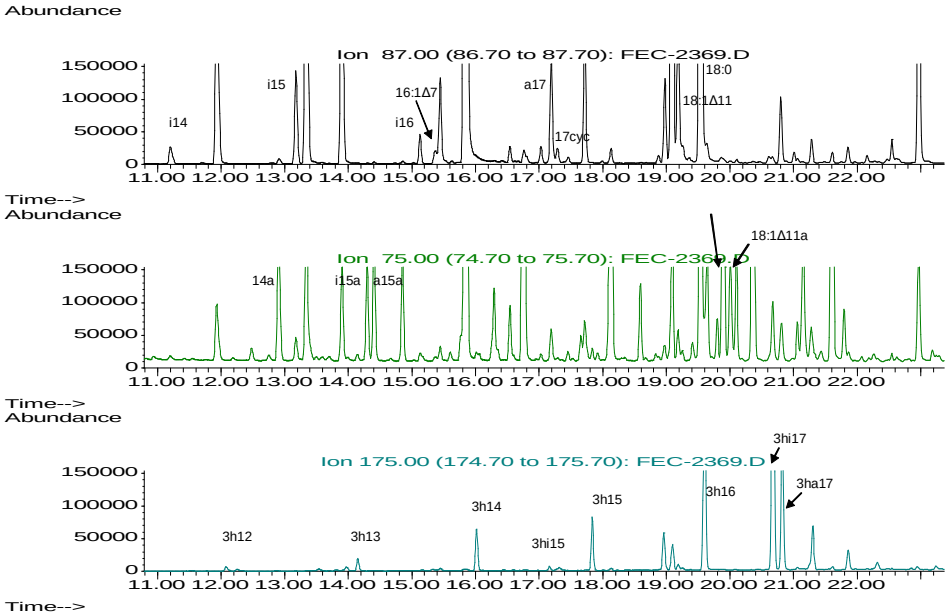

Рис. 1. Селективные хроматограммы жирных кислот (ион 87, верхний рисунок), жирных альдегидов (ион 75, рисунок в середине) и гидрокси-кислот (ион 175, нижний рисунок), экстрагировпнных из клинического материала, содержащего микроорганизмы и/или их маркеры. Обозначения веществ: 17:1 - 17- число атомов 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.

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 Ajilent Technologies - это опция **calculate** в меню **quantytate** программы **Enhanced Data Analysis.**

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.

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

- Нормальные прямоцепочечные жирные кислоты образуют сетку маркерных пиков, которые выходят через равные промежутки времени. Их место при необходимости можно находить, измеряя промежутки линейкой на хроматограмме или экране монитора
- Антеизо-кислоты выходят раньше нормальных на 0,35мин, изо-кислоты на 0,5мин, 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. Причем 2h изомер сдвинут относительно и 3h варианта на +0,05 мин). Оксилауриновые кислоты (h12) выходят спустя 0,3 мин после С14:0, 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 С20:0.
- Общим для простых ЖК является ион 87, для оксикислот - ион 175, жирных альдегидов – ион 75

Для маркеров, характеризующихся двумя ионами, наличие сигнала ионного тока в обоих 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 3. Шаблоны для первичной верификации данных распечатывают на принтере, используя собственные измерения.

5. 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 лаборатории хромато-масс-спектрометрии Академической группы академика РАМН Ю.Ф.Исакова (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.

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 исключения микроорганизмов, маркеры которых отсутствуют: например, отсутствие оксикислот сразу же исключает из анализа грамотрицательные микробы, отсутствие альдегидов – большую группу плазмологенсодержащих организмов; наличие/отсутствие альфа-оксикислот предполагает или отвергает наличие определенных видов, для которых характерны сфинголипиды, включающие в себя эти альфа-оксикислоты (в отличие от бета-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**:

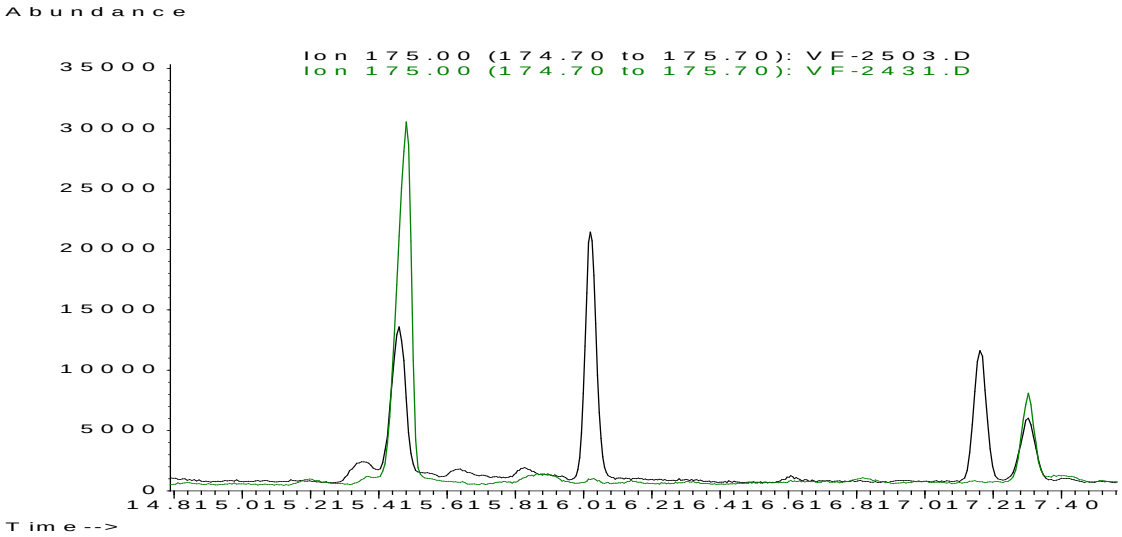

Рис. 2. Концентрация маркера сем. **Enterobacteriacea – бета-оксимиристиновой кислоты (h14)** – время по шкале абсцисс 16.02 мин – при заболевании (верхняя кривая) по сравнению с нормой (нижняя кривая)

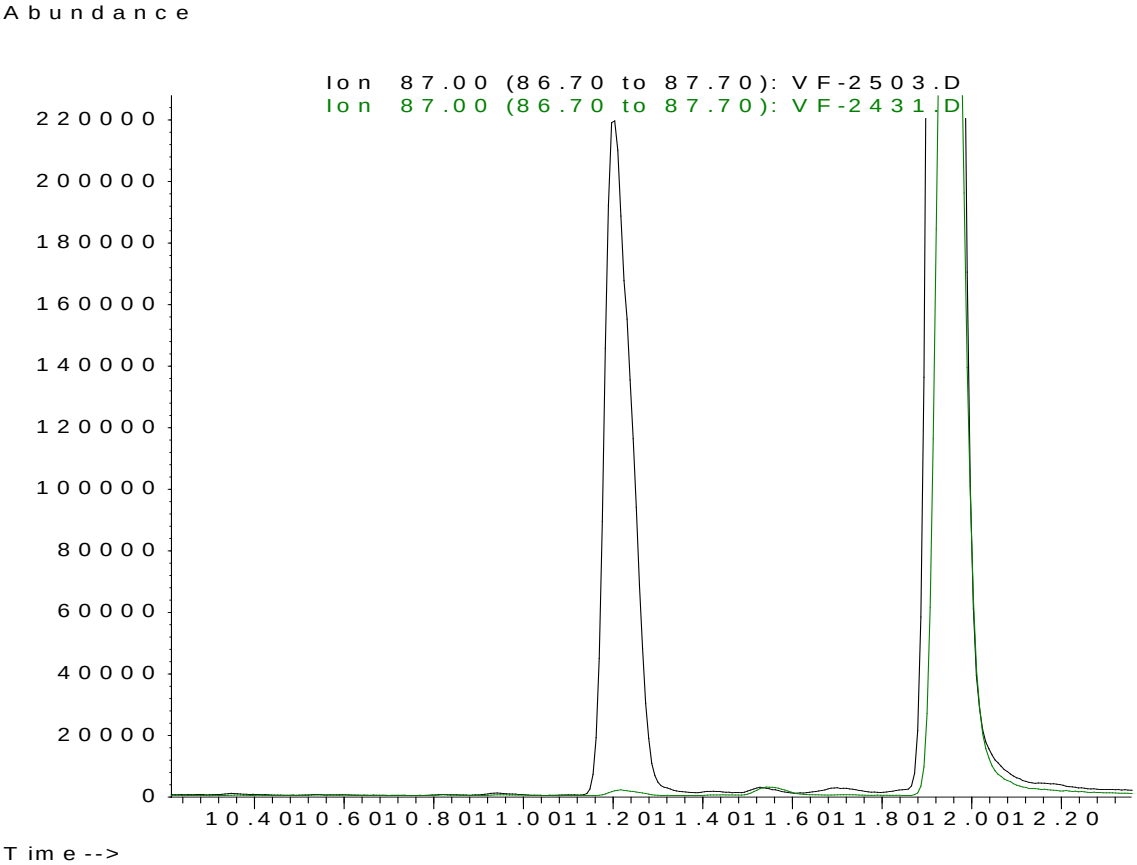

Рис 3. Маркер **анаэробного пептострептококка – изо-миристиновая кислота, i14** (время выхода 11.23). Его концентрация возросла в 50 раз у больного по сравнению с уровнем нормы (нижняя кривая; большой пик справа – миристиновая кислота фона)

Ошибка количественных измерений состава кожного сала и численности микроорганизмов из-за погрешности в подготовке проб и анализа, несоответствия состава жирных кислот чистых культур банка данных и изучаемого сообщества *in situ* (биологическая воспроизводимость) может составлять до 20 % относительных.

IV. Микробиота кишечника при дерматитах и ее нозологическая специфичность.

1. Реконструкция микробиоты по данным состава микробных маркеров в крови

Результаты измерения концентраций микробных маркеров в крови пациентов с дерматитами и последующей реконструкции микробного сообщества пристеночного слоя кишечника (33) Полеско, 2007 показало, что оно заметно отличается от среднестатистической нормы (табл 4).

Таблица 4

Результаты анализа состава микробиоты пристеночного слоя кишечника у больных себореей (N=16) в сравнении с нормой. Данные в размерности [клеток/мл x10^5]

№	Микроорганизм	Норма крови	Seb-19	Seb-20	Seb-21	Seb-22	Seb-23	Seb-24	Seb-25	Seb-26	Seb-27	Seb-28	Seb-29	Seb-30	Seb-31	Seb-32	Seb-33	Seb-34
1	Streptococcus	249	44	0	0	95	0	0	0	139	318	201	292	97	0	126	360	489
2	Eubacterium lentum	68	320	495	349	603	336	500	680	779	474	177	211	186	226	181	255	369
3	Bacillus cereus	23	31	0	0	88	0	0	32	39	47	30	0	0	0	30	0	61
4	Peptostreptococcus anaerobi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	Clostridium hystolyticum	95	24	59	18	152	89	51	17	56	7	0	0	0	0	0	0	0
6	Nocardia, 14:1d11	262	314	532	106	1854	319	244	331	669	1380	263	81	805	0	588	232	847
8	Acinetobacter	0	0	7	0	7	4	2	3	23	3	6	5	0	0	0	0	0
9	Pseudomonas aeruginosa	0	0	11	0	7	6	10	2	13	5	5	4	6	0	8	0	0
12	Clostridium propionicum	288	25	175	19	369	203	64	0	34	0	3	42	24	66	35	27	0
15	Актиномицеты	77	47	63	45	103	60	65	42	50	52	39	24	28	47	29	37	29
16	Pseudonocardia	70	28	34	22	60	34	32	21	32	26	20	17	14	24	18	20	16
17	Streptomyces	62	157	168	200	381	167	140	136	105	311	114	105	134	154	167	190	253
18	Clostridium ramosum	2000	8061	5824	2595	6373	4799	2766	5562	3123	3977	2474	1814	3306	473	4174	5417	4292
19	Fusobacterium/Haemophylu	0	6	16	6	9	10	6	2	17	3	10	7	2	16	6	3	2
20	Alcaligenes	48	37	28	47	57	27	74	38	40	46	39	31	37	138	34	33	23
22	Flavobacterium	0	7	10	0	14	8	8	7	8	6	0	0	0	0	0	0	0
23	Rhodococcus	423	353	479	383	775	404	536	304	380	382	283	261	218	478	274	408	239
25	Porphyromonas	0	6	11	0	14	9	8	8	9	9	0	0	0	0	0	0	0
26	Corineform	605	207	254	232	455	282	277	227	160	330	176	117	191	266	246	302	332
27	Lactobacillus	6613	5542	5188	3417	4734	6038	7393	4260	3918	4392	3034	3618	3886	4508	4886	4846	3765
28	Campylobacter mucosalis	99	40	69	1	110	45	38	1	1	34	1	1	45	4	1	1	42
29	Mycobacterium/Candida	549	490	824	249	1210	548	383	391	497	578	318	150	538	185	562	520	550
30	E.coli	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	Eubacterium moniliforme	0	232	114	105	80	85	0	97	713	102	43	53	34	0	0	122	73
32	Cl.difficile	385	222	232	176	235	183	241	231	151	250	154	146	111	299	188	294	235
34	Prevotella	38	33	39	42	34	30	40	22	88	36	50	40	40	121	71	51	30
35	Eubacterium sp	6912	8574	15248	6815	13219	11397	17176	14510	26644	13453	10536	7212	6660	5625	6075	7494	8287
36	Bacteroides fragilis	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	Staphylococcus	120	327	277	221	382	195	271	234	238	266	147	115	145	213	197	234	232
38	Bifidobacterium	5067	4654	6449	4764	7133	6010	4725	5109	8402	5142	5636	3632	4309	4736	4667	4992	3131
39	Helicobacter pylori	14	18	55	0	35	62	28	11	73	22	38	12	12	52	17	25	48
40	Clostridium perfringens	12	36	39	131	32	24	140	11	21	23	24	25	29	733	37	30	35
41	Enterococcus	290	359	385	0	535	0	311	308	239	309	285	0	286	370	410	323	191
43	Eubacterium sp	4480	3165	4601	2356	3998	1544	3632	5464	7263	8381	1673	1961	976	2541	1672	2163	1975
44	Streptococcus	229	701	449	647	565	493	731	394	518	484	188	185	225	2083	162	232	256
45	Herpes	59	1553	130	170	97	52	306	29	178	59	69	74	60	22	113	37	39
46	Микр грибы, кампестерол	842	509	194	229	251	396	244	292	545	485	165	261	523	0	306	316	327
47	Nocardia asteroides	274	471	359	487	677	567	501	526	223	595	282	393	240	406	336	371	615
48	Цитомегаловирус	166	204	271	55	97	173	97	44	100	167	79	0	0	0	0	148	0
49	Микр грибы, ситостерол	384	303	169	158	186	255	208	226	389	336	149	205	306	122	167	214	256
50	Propionibacterium acnes	101	115	174	0	128	48	57	879	352	89	83	40	207	39	69	108	43
51	Ruminicoccus	640	954	1313	608	1303	740	974	1262	1075	856	470	231	500	313	614	794	652
52	Actinomycetes 10Me14	309	229	472	171	402	326	223	177	846	230	155	136	0	0	0	225	90
53	E.lentum 7741	0	86	0	0	0	6	16	0	319	0	33	0	0	0	0	0	34
54	Enterococcus faecalis	231	196	242	177	152	240	244	184	77	159	91	0	272	304	101	386	380
55	Actinomyces viscosus	1190	1103	1468	634	1175	1057	1135	0	2079	853	720	527	842	1884	864	1239	822
56	Eubacterium spp.	194	0	263	94	174	52	195	2325	189	215	58	137	163	37	72	163	90
57	Helicobacter mustelae	140	275	169	149	199	242	202	0	623	289	278	269	209	102	177	208	186
	Сумма	33610	40057	47362	25877	48558	37596	44293	44397	61439	45182	28596	22433	25668	26586	27679	32821	29336

Данные представлены в количестве клеток, эквивалентных концентрации маркеров, на мл крови. Их сумма представляет собой сумму клеток микроорганизмов, информация о которых дошла до крови – это $3.3x10^9$ кл/мл (для нормы, первая колонка табл 4) , то есть на порядок меньше, чем в мукозном слое тонкого кишечника ($7.6x10^{10}$ кл/г). Если считать, как это принято, что в организме человека обитает 10^{14} микробов, а объем крови взрослого человека составляет 5л, то в нем содержится информация о 5000 x $3.3x10^9$ кл/мл= $1.6x10^{13}$ микробов. Информацию о порядке величины мы теряем по сравнению с измерениями микробиоты непосредственно в кишечной стенке за счет ухода части отмерших микробов в фекалии и утилизации части микробных жирных кислот для обновления клеток организма – хозяина.

По выработанному ранее статистическому критерию (30, Белобородова, 1999) отклонения от нормы приобретают клиническую значимость, когда численность микроорганизмов изменяется вдвое по сравнению с нормой. В таблице 4 такие случаи выделены цветом. Превышение нормы более чем вдвое – желтым, уменьшение более чем

наполовину – бирюзовым. В этом случае таблица приобретает полосатый вид, в котором желтые полосы отмечают регулярный избыточный рост бактерий в организме, а бирюзовые – дефицит.

Как видно, общие изменения микроэкологического статуса организма при себорее связаны с пятикратным ростом концентрации, более чем двадцатикратным увеличением концентрации фузобактерий и *Eubacnerium moniliforme*. *Eubacterium* – родственные клостридиям микроорганизмы, являющиеся одними из основных обитателей кишечника. Условные патогены с развитой системой видов и штаммов с универсальными свойствами. В том числе для них характерно индуцирование продукции провоспалительных цитокинов и TNF-alfa, а также противовоспалительного цитокина IL-10 (как ЛПС или клеточные токсины Грам+ патогенов). Это обуславливает их участие в патологии тяжелых заболеваний, таких как, средиземноморская семейная лихорадка, эндокардит, врожденный порок сердца, кожные и кишечные заболевания, связанные со сложным изменением концентрации их видов в биотопах.

Более чем вдвое растет концентрация маркеров *Clostridium ramosum* и актинобактерий Streptomyces, почти у всех больных возрастает количество *Clostridium perfringens,* - до 10 и 100 раз (рис 4). Хотя этот микроб не дает существенного абсолютного вклада в изменение микроэкологии больных себореей в целом, его нельзя недооценивать в патологическом плане: *Clostridium perfringens* образует как минимум 12 токсинов и энтеротоксин. Мишени для основных токсинов – биологические мембраны в различных тканях. Поражения обуславливают ферментативные процессы, катализирующие гидролитическое расщепление и нарушение клеточной проницаемости с последующим отеком и автолизом тканей, характерными для газовой гангрены.

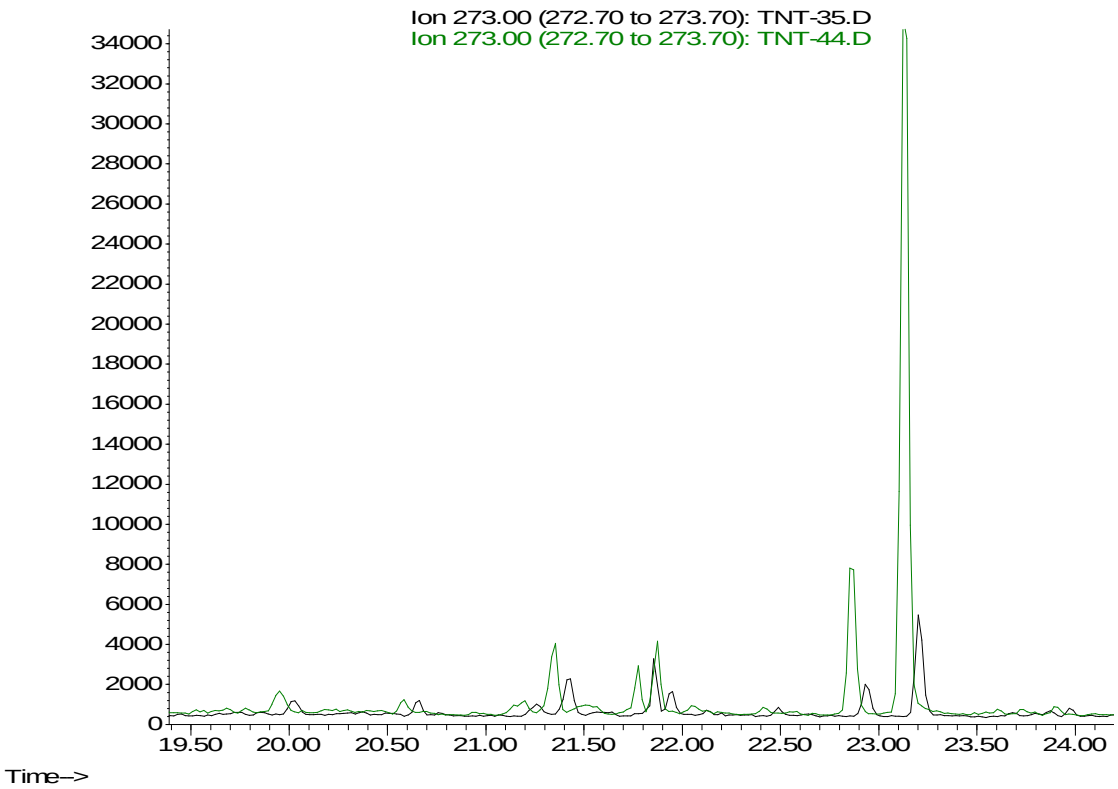

Рис. 4 Маркеры Clostridium perfringens в крови (следовательно – на кишечной стенке) больных себореей на порядок выше нормы (хроматографические пики в районе отметки 23.00 – время в мин)

В части изменений микробиоты кишечника наблюдается аналогия с родственным себорее заболеванием – акне (вульгарные угри). Оба эти состояния сопровождаются ростом числа *Clostridium perfringens, Eubacterium lentum, Clostridium ramosum* при дефиците лактобацилл (рис 5). Но при угревой болезни более выражен рост колонизации кишечника бактериями Helicobacter pylori. Этот микроорганизм, хорошо известный участием в микробной этиологии язвенной болезни, в последнее время обнаруживается и в других органах – полости рта, печени, прямой кишке, атеросклеротических бляшках. На этом фоне обнаружение H. pylori в других отделах пищеварительного тракта в норме и патологии не выглядит необычным. Патогенность *H. pylori* известна: проникая через слизь, бактерии прикрепляются к эпителиальным клеткам, проникают в железы слизистой оболочки. ЛПС микроорганизмов способствует миграции нейтрофилов и развитию острого воспаления. Под действием бактериальной уреазы мочевина превращается в аммиак, повреждающий слизистую оболочку.

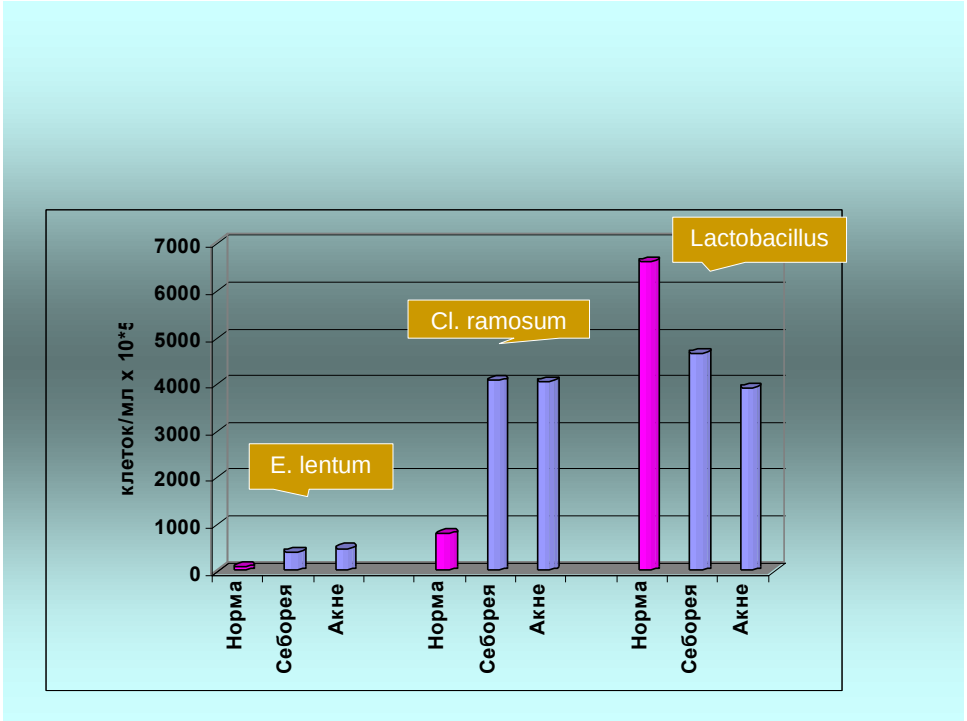

Рис 5. При себорее (как и при акне) наблюдается избыточный рост *Eubacterium lentum* и *Clostridium ramosum* на кишечной стенке при дефиците лактобацилл

2. Нозологическая специфичность дисбиоза кишечника при дерматитах

Несмотря на частичное сходство с акне, себорея сопровождается иными изменениями кишечной микрофлоры, чем при атопическом дерматите, или акне, которые легче проследить на диаграммах дисбиоза (рис 6,7,8). При себорее растет численность видов главных анаэробов кишечника *Eubacterium*, клостридий группы *C. ramosum*, актинобактерий *Nocardia* и *Streptomyces* при дефиците *Lactobacillus, P. freudenreichii* и *Corynebacterium*.

Обследование методом ГХ-МС микробных маркеров в крови пятидесяти детей в возрасте от одного месяца до 12 лет с диагнозом атопический дерматит (АД) выявило у большинства из них систематический избыточный рост в тонком кишечнике основной группы эубактерий (E. moniliforme, E.nodatum, E.sabureum), а также E.lentum (Eggertella lenta), пропионобактерий группы P. Freudenreihii, оральных стрептококков, клостридий (C.perfringens, C. Propionicum, C. Difficile и других), нокардий, энтеробактерий, цитомегаловируса и Helicobacter pylori (рис. 8). Клинически значимые превышения уровня колонизации пристеночного слоя тонкого кишечника найдены также для бацилл (B. cereus), видов Alcaligenes. В то же время концентрация маркеров бифидобактерий и лактобацилл у половины обследованных ниже нормы.

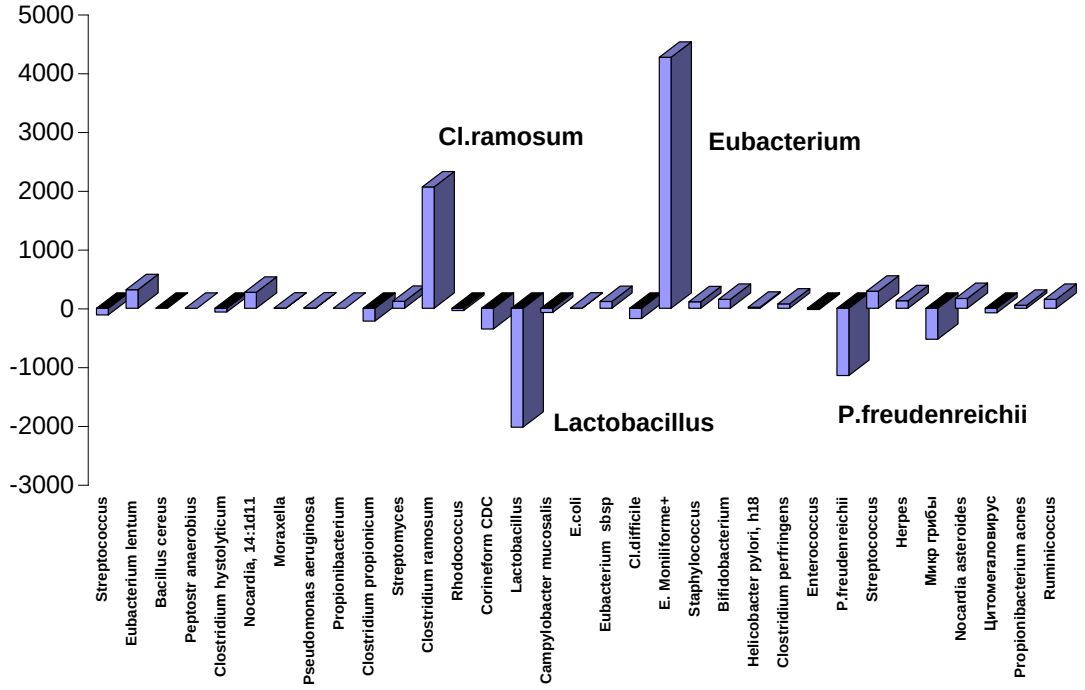

Рис 6. Избыточный рост в кишечнике больных себореей видов Eubacterium, клостридий группы C. Ramosum, актинобактерий Nocardia и Streptomyces при дефиците Lactobacillus, P. freudenreichii и Corynebacterium. Нулевое сечение в центе рисунка – норма. Отклонение в плюсовую сторону – избыточный рост, в минусовую – дефицит.

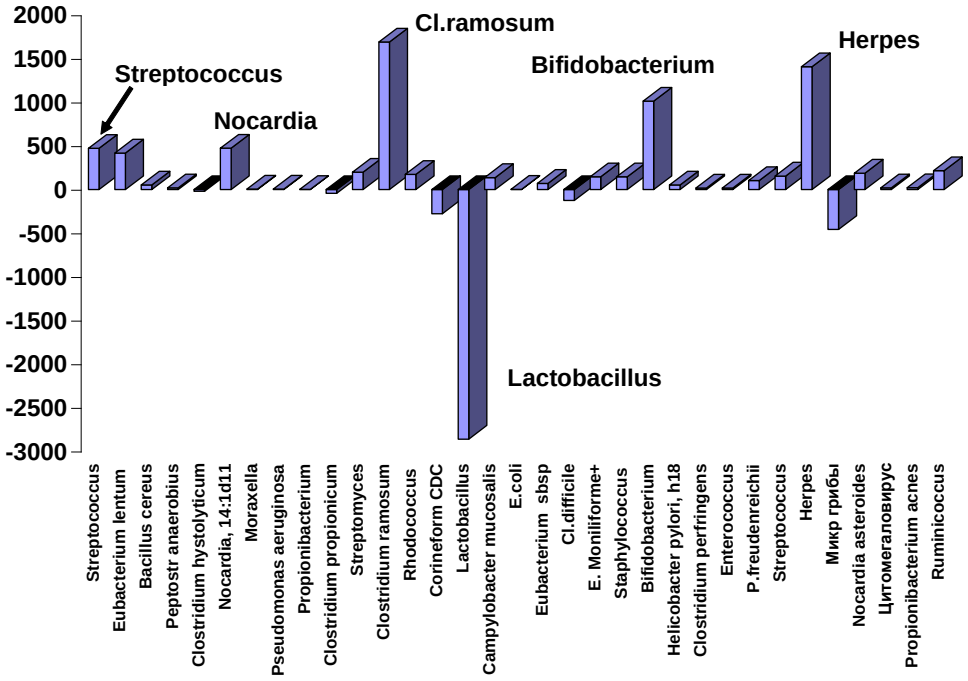

Рис 7. Избыточный рост в кишечнике больных акне стрептококков, клостридий группы C. ramosum, бифидобактерий, актинобактерий Nocardia и Streptomyces при дефиците видов Lactobacillus и Corynebacterium.

Кроме того, на фоне изменения концентраций указанных выше микроорганизмов, наблюдаются частные изменения многих других микробов из числа обитателей кишечника, происходящие только у некоторых больных как в сторону увеличения, так и уменьшения, - то есть индивидуальные вариации частного дисбактериоза. Возможно, с этим связана атопика - неопределенность локализации и характера клинических проявлений АД. К этим микроорганизмам относятся Peptostreptococcus anaerobius, Moraxella, Pseudomonas aeruginosa, Stenotrophomonas maltophilia, Pseudonocardia, Streptomyces, Fusobacterium/Haemophylus, дрожжи Candida и Malassezia.

При алопеции микробное сообщество кожи равно как и микробиота кишечника претерпевают существенные изменения. Лидерство в избыточном росте на коже приобретают анаэробы (клостридии группы гистолитикум, анаэробные пептострептококки, бактероиды) и микроскопические грибы, продуцирующие кампестерол или ситостерол. К ним присоединяются уже упоминавшиеся в связи с акне альфа-стрептококки, коринебактерии, стрептомицеты и пропионобактерии. Изменение численности микроорганизмов в зоне сальных желез составляет величину от 10 до 1000 крат. Разумно предположить, что это обстоятельство препятствует росту волос, поскольку морфологические изменения в коже приписывают в основном воспалительным процессам. Последние, как правило, связывают с наличием инфекции или избыточной колонизацией автохтонной микрофлорой. В кишечнике большинства обследованных обнаруживается избыточный рост суммарной микробиоты, преимущественно за счет микроскопических грибов, продуцирующих кампестерол, эубактерий, бактероидов, клостридий, стрептококков и некоторых актиномицетов.

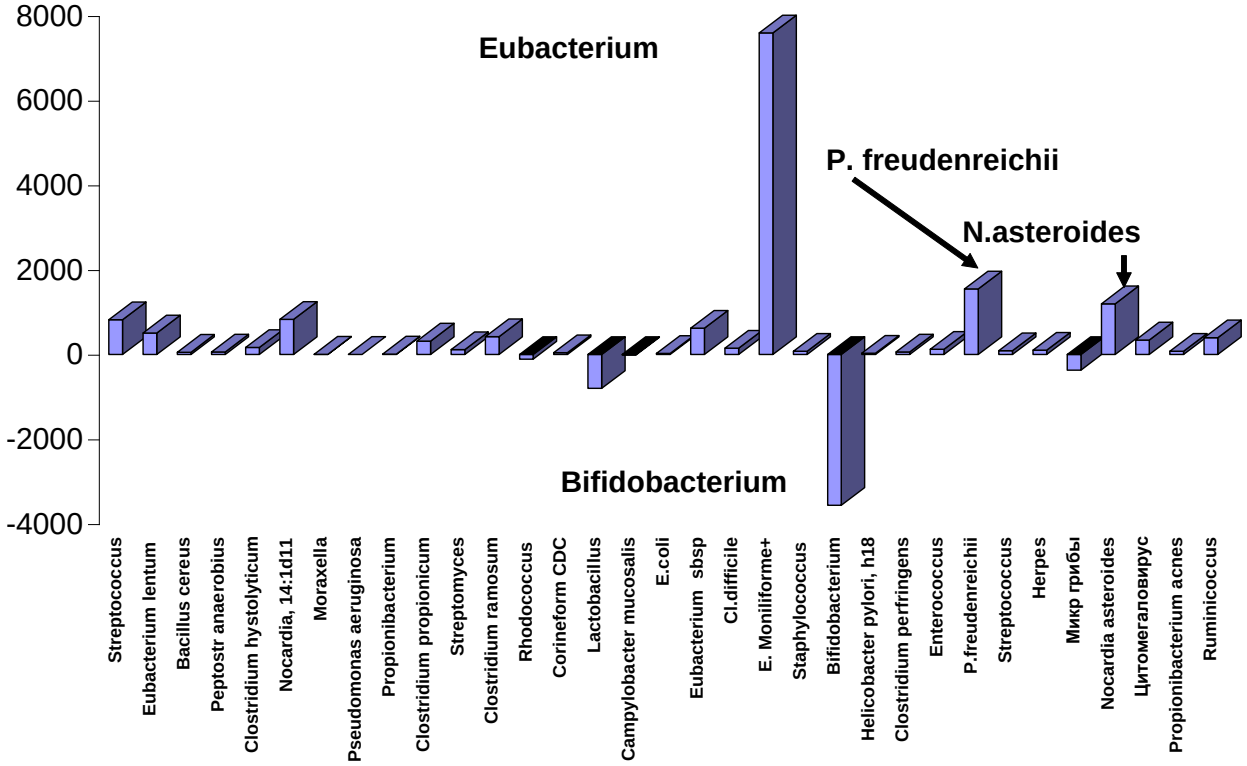

Рис 8. Избыточный рост в кишечнике больных атопическим дерматитом видов Eubacterium, актинобактерий Nocardia и P. freudenreichii при дефиците бифидобактерий

Подтвердить специфичность изменения кишечной микробиоты помогает графическое сопоставление дисбактериоза при упомянутых кожных заболеваниях и при других патологиях - синдроме раздраженного кишечника (СРК) (рис.9) и периодической болезни – средиземноморской семейной лихорадке (рис. 10). При СРК 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. Кроме того, растет численность анаэробов *Bacteroides fragilis, Porphyromonas, Propinobacterium acnes*, при периодическом избытке энтеробактерий, клостридий группы *C. ramosum* и *Eggertella lenta,* а также *Campylobacter mucosalis*, энтерококков, псевдомонад, *Acinetobacter*, бацилл и стрептококков. Эта группа микробов, вероятно, является источником токсинов, поддерживающих заболевание при дефиците противодействия со стороны основных представителей нормальной микробиоты.

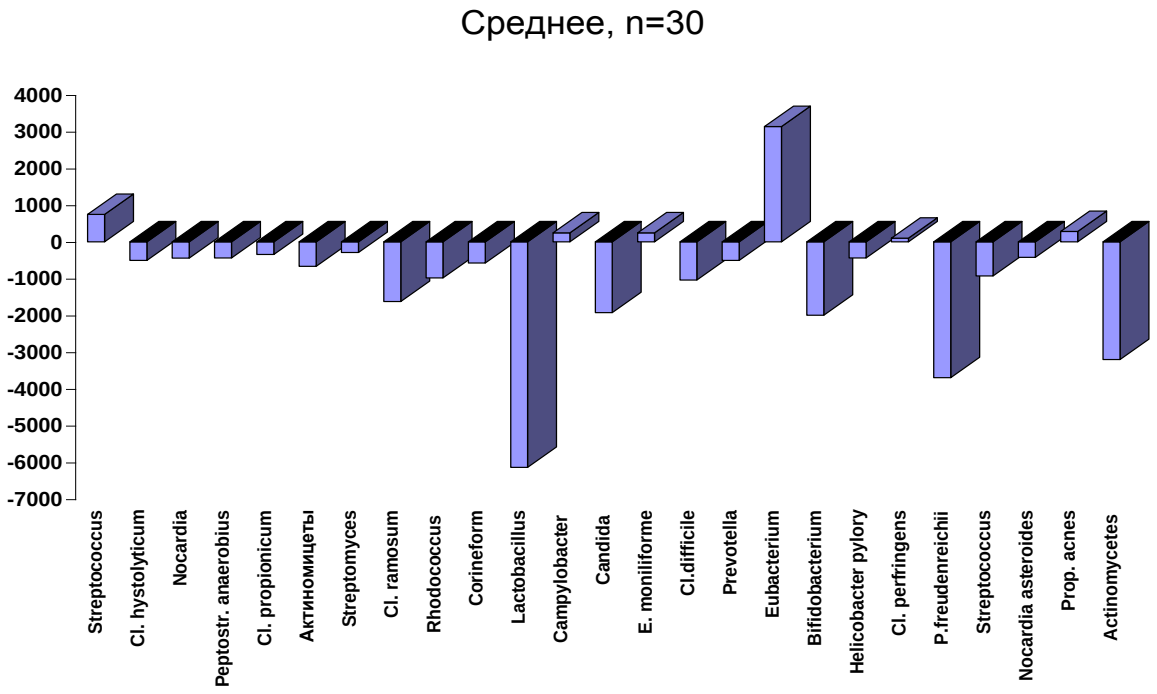

Рис 9. СРК. При синдроме раздраженного кишечника наблюдается тотальный дефицит кишечной микробиоты до семикратного снижения общей численности микроорганизмов при избыточном росте эубактерий и стрептококков.

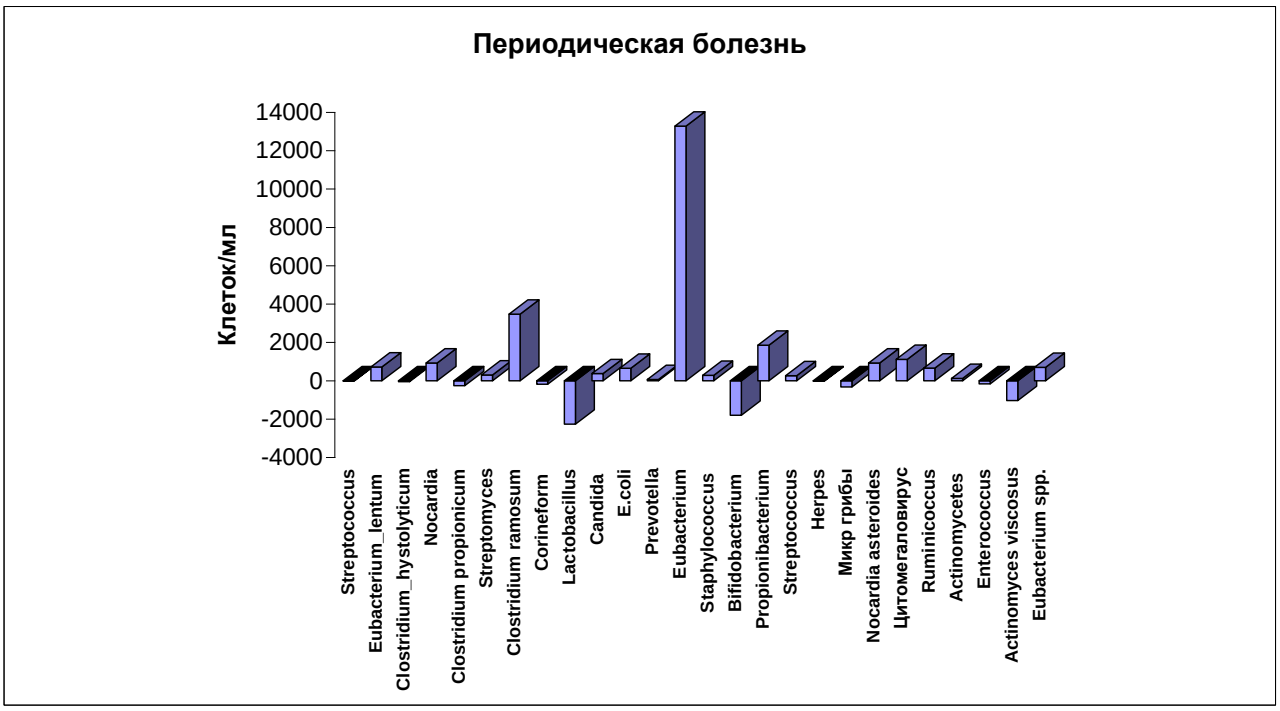

Рис 10. Дисбиоз при периодической болезни характеризуется большим избыточным ростом основной группы эубактерий, клостридий группы C.ramosum, пропионобактерий, нокардий и других микроорганизмов при дефиците лактобацилл, бифидобактерий и Actinomyces viscosus.

V. Микробиота кожи и состав кожного сала

1. Роль дрожжеподобных грибов Malassesia в инфицировании кожи

Для выяснения участия дрожжеподобных грибов Malassesia в инфицировании кожи при себорейном дерматите была предпринята попытка поиска его маркеров при культивировании на искусственной твердой среде с различными липидными добавками. При первом анализе в биомассе гриба, полученной при использовании стандартной среды с желчью, были обнаружены не характерные для грибов, но специфичные для желчи, холаноевые кислоты и их производные (34) Кабаева . Олеиновая кислота и холестерин доминируют в липидных профилях культур гриба, если они использовались в качестве добавок при культивировании. Разнообразие ЖК и алифатических жирных спиртов, характерных для себума, обнаруживается в его клетках при росте на среде, содержащей кожное сало.

В результате можно сделать вывод о том, что Malassesia использует материал субстрата для построения собственных липидов. Вряд ли компоненты таких липидов могут быть использованы в качестве его молекулярных маркеров при исследовании его содержания в пробах при угревой болезни. Маркеры были найдены при анализе содержимого комедона. Оказалось, что оно представляет собой в основном кожное сало. Уровень содержания в нем арахидоновой кислоты соответствует норме себума, что не допускает наличия заметного количества лейкоцитов. Однако уровень содержания ряда микробных маркеров превышает норму. Кроме компонентов себума в комедоне обнаруживаются маркеры стафилококков, пропионобактерий, стрептококков (оральных или S.pyogenes), коринебактерий, клебсиелл и бифидобактерий, а также высокая концентрация гидрокси-кислот с 18 атомами углерода (2h18, 3h18, 10h16 и 10h18). Оказалось, что и в самой культуре дрожжей Malassezia эти вещества присутствуют в большой концентрации, особенно 10h16 (10-гидрокси-пальмитиновая) кислота, содержание которой достигает 10 мг/г биомассы. Она и была принята в качестве основного маркера при исследовании концентрации Malassezia в различных биоматериалах и ее изменения при заболеваниях кожи. В результате было найдено, что концентрация 10h16 на коже в норме у доноров (n=15) составляет в среднем 14,4 нг/мл кожного сала, в крови – 6, ногтях – 2, фекалиях – 33 нг/мл. При акне (n=50) содержание малассезии не отличается от нормы и составляет 15,2 нг/мл, при алопеции (n=30) – 5-8 нг/мл. При этом, как у доноров, так и у больных отмечены единичные случаи высоких концентраций маркера Malassezia – до 200 нг/мл. Однако при себорее в капиллярной крови с кожи головы (n=10), равно как и в кожном сале (n=15), получен устойчиво повышенный уровень его содержания 52,7 нг/мл в среднем. Измерения проведены одним методом в количественно сопоставимом режиме при биологической воспроизводимости 20% относительных. Этот опыт

убедительно показывает, что только в случае себорейного дерматита дрожжи Malassezia можно рассматривать в качестве одного из инфекционных агентов (рис.9)

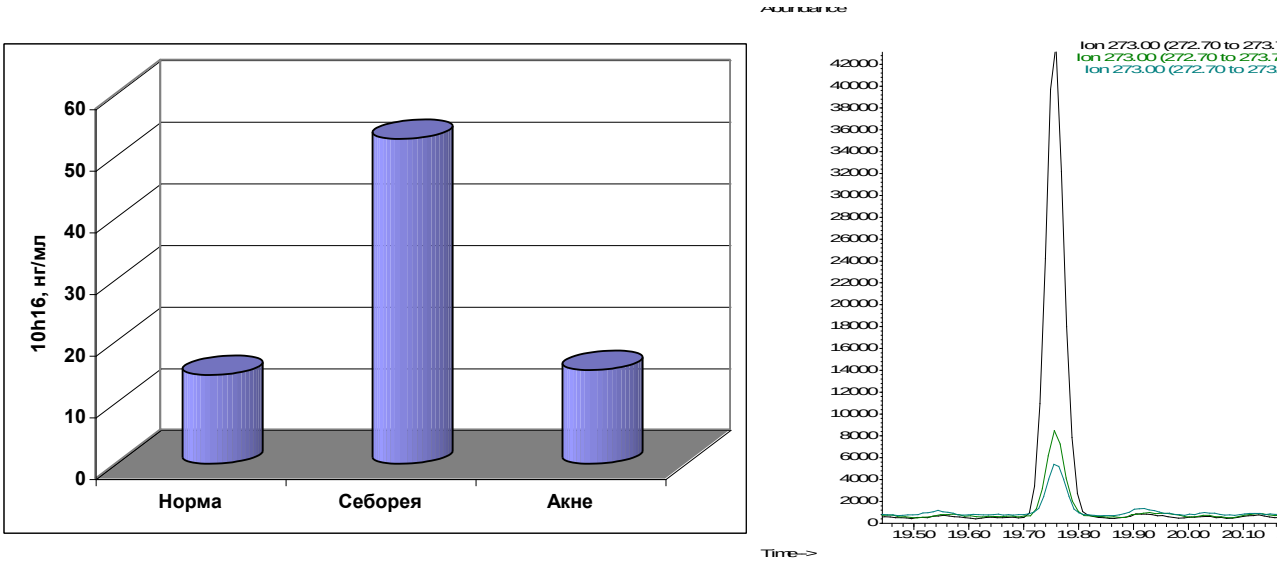

Рис 9. Среднее значение маркера дрожжей Malassezia в кожном сале при себорее и акне Справа – вид селективной хроматограммы 10h16 (10-гидроксипальмитиновой кислоты), маркера Malassezia, при тяжелой форме заболевания. Высота пика растет в ряду норма-акне-себорея.

2. Состав кожного сала и микробных маркеров кожи при дерматитах

Хромато-масспектрометрический анализ проб кожного сала и соскобов пораженных участков показал наличие более 200 веществ из числа жирных кислот, алифатических и полициклических спиртов (стеролов) и альдегидов, входящих в состав кожного сала клеток кожи и микроорганизмов. В соскобах с пораженных участков кожи при разных дерматитах обнаруживаются маркеры микроскопических грибов, коринебактерий, актинобактерий Streptomyces, Rhodococcus, Propionibacterium, грамотрицательных микроорганизмов сем. Enterobacteriaceae, родов Pseudomonas, Acetobacter, Flexibacter, анаэробов Bacteroides, Prevotella, Clostridium perfringens и других (табл 5). Суммарная микробная нагрузка при этих заболеваниях увеличивается более чем вдвое за счет грибов, стафилококков, клостридий и грамотрицательной составляющей инфекции.

Таблица 5

Состав микробных маркеров в соскобах с пораженных участков кожи при разных дерматитах

			Концентрация маркера, нг/г			
Вещество-маркер	Символ	Вероятный микроорганизм	Норма[4]	АТД[1]	Псориаз[2]	Алопеция[3]
Декановая кислота	10:0	α-стрептококки	0	60	0	0
антеизо-тридекановая	a13	Bacillus	0	34	33	418

изо-тетрадекановая	i14	P.anaerobius	0	532	502	472
9-тетрадеценовая	14:1ω5	S. pneumonia	0	167	111	13464
изо-пентадекановая	i15	Propionibacterium	320	1133	979	695
антеизо-пентадекановая	a15	Staphilococcus	265	1990	1638	6200
пентадеценовая	15:1	Clostridium	0	0	0	11162
изо-гексадекановая	i16:0	Streptomyces	128	520	996	0
изо-гептадеценовая	i17:1	Flavobacterium	0	42	19	2027
гептадекановая	17:1	Candida	26	300	317	11922
антеизо-гептадекановая	a17:0	Коринебактерии	6667	2377	2049	3438
10-метил-гексадекановая	10Me16	Rhodococcus	20000	2651	2292	17915
2-гидрокси-тетрадокозановая	2h24	грибы	3333	25101	27819	3366
2-гидрокси-гексадокозановая	2h26	грибы	0	17944	33663	1035
сквален		грибы	13333	0	0	11368
эргостерол		грибы	0	0	0	100
3-гидрокси-декановая	3h10	Pseudomonas	0	0	0	362
3-гидрокси-додекановая	3h12	Pseudomonas	200	905	724	2353
3-гидрокси-тетрадекановая	3h14	Enterobacteriaceae	400	1267	1629	4886
3-гидрокси-изо-пентадекановая	3hi15	Porphiromonas	0	0	0	5972
3-гидрокси-гексадекановая	3h16	Prevotella	6200	9953	19544	15020
3-гидрокси-изо-гептадекановая	3hi17	Bacteroides	0	2353	2353	0
10-гидрокси-октадекановая	10h18	C. perfringens	1900	9229	6877	10315
3-гидрокси-октадекановая	3h18	Acetobacter	1100	7962	41983	15744
2-гидрокси-изо-пентадекановая	2hi15	Flavobacterium	0	0	4343	0
2-гидрокси-изо-гептадекановая	2hi17	Flexibacter	0	27687	23887	0
		Сумма	53872	112209	171757	138232

[1] – атопический дерматит, девочка, 7 лет, предплечье; [2] – девочка, 5 лет, голень; [3] - девочка, 14 лет, голова; [4] – контроль, девочка, 5 лет, предплечье

Сто двадцать два вещества отнесены к воскам кожного сала. Это пряпоцепочечные, разветвленные, ненасыщенные ЖК и спирты с числом углеродных атомов от 10 до 30. Как и при угревой болезни (34, Кабаева, дис) у больных СД изменения носят индивидуальный характер (табл. 6). Можно отметить у больных тенденцию к увеличению доли длинноцепочечных ЖК с числом атомов улерода от 20 до 30 по сравнению с короткоцепочечными - от 10 до 20атомов углерода. У некоторых пациентов наблюдается увеличение 4-5 раз доли изо-кислот. Соотношение эндогенных и экзогенных липидов меняется хаотично от 1,4 до 3,0 при норме 2,0. Концентрация насыщенных и ненасыщенных ЖК примерно одинакова (по 40% от суммы липидных веществ) в норме и патологии. В общем профиле ЖК и спиртов себума доминирует себпальмитат (сапиеновая, цис-6-гексадеценовая кислота - 16:1Δ6, около 16%) далее в рейтинге следует олеиновая и стеариновая кислоты (14 и 5 % соответственно) и холестерол – 7%.

Таблица 6

Групповой состав жирных кислот и спиртов кожного сала у больных себореей в сравнении с нормой

Больные себореей	Норма

	1	2	3	4	
	Состав в деципроцентах*				
Сумма ЖК с числом атомов углерода от 16 до 20	561,38	535,53	591,10	556,25	578,97
Сумма ЖК с числом атомов углерода от 21 до 27	59,83	55,15	49,50	32,17	38,35
Соотношение этих сумм С16-20/С21-27	9,38	9,71	11,94	17,29	15,10
Сумма насыщенных ЖК С:0	425,84	390,39	483,01	373,45	382,92
Сумма ненасыщенных ЖК С:1-3	376,44	417,90	344,12	396,91	401,50
Соотношение этих сумм С:0/С:1-3	1,13	0,93	1,40	0,94	0,95
Сумма насыщенных ЖК и спиртов	504,90	473,43	539,93	479,20	470,92
Сумма ненасыщенных ЖК и спиртов	431,31	467,40	384,16	459,03	451,14
Соотношение этих сумм	1,17	1,01	1,41	1,04	1,04
сумма iso-кислот	60,91	72,94	17,74	14,06	17,40
Соотношение восков к фосфолипидам	2,38	2,49	1,39	2,97	1,92

- - сумма веществ взята за 1000

Основными бактериальными агентами акне и себореи считаются микроскопические грибы рода Malassesia, бактерии Propionibacterium acnes и стафилококки. Метод ГХ-МС позволил подтвердить и расширить список микроорганизмов кожи, участвующих в процессе заболевания, а также обнаружить систематические изменения состава микрофлоры кишечника, сходные у обследованных больных (34) Кабаева, 2005. Действительно, концентрация маркера малассезии 10-гидрокси-пальмитиновой кислоты (10h16) существенно выше у больных себореей, а при акне меняется незначительно (рис 9). Кроме того в глубинных слоях кожи наблюдается усиленный рост дрожжей кандида (маркер – гептадеценовая кислота) и других микроскопических грибов: не идентифицированных, но обнаруженных по продукции специфических стеролов – кампестерола и ситостерола. Кроме P.acnes, микроба, видовое определение которого стало названием заболевания, найдены маркеры пропионовых бактерий других видов и морфологически сходных с ними коринебактерий и актиномицетов, которые в сумме также обнаруживают избыточный рост на коже больных. Аналогичным образом оказалось, что стафилококки не являются единственным представителем кокковых форм при себорее и акне. К ним следует добавить стрептококки и руминококки.

В кожном сале обнаружены минорные количества (менее 1%) ЖК и альдегидов, специфичных для микроорганизмов. Жирные кислоты с числом атомов углерода от 12 до 20 являются характерными компонентами клеточной стенки бактерий. Эргостерол – маркер микроскопических грибов, b-Sitosterol – стерол растений, но его синтезируют и грибы. Гидроксикислоты известны как маркеры грамотрицательных бактерий. Выделяются по концентрации гидрокси-миристиновая (3h14) кислота, которая в данных сообществах может быть признаком видов *Enterobacteriaceae* или *Burkholderia*. Наличие α- и β-оксикислот (гидроксидекановых и гидроксилауриновых) определенно указывает на наличие псевдомонад и *Acinetobacter* sps. 10-гидрокси-стеариновая кислота (10h18) относится в основном к *Clostridium perfringens* и *Malassesia*, а также к двум-трем другим бактериям, способным образовывать этот продукт при окислении олеиновой кислоты.

На порядок выше концентрация гидроксикислот с 16 и 18 атомами углерода в цепи. Часть кислоты 3h16 (гидроксипальмитиновая) относится к *Burkholderia* (маркер 3h14), но основное ее количество, по остатку, принадлежит другим организмам, предположительно видам *Wolinella-Acholeplasma-Roseomonas*. Гидроксистеариновая кислота (3h18) обнаруживается у видов *Acetobacter, Helicobacter, Francisella*.

Не обнаружены пента- и гепта-декановые 3-гидроксикислоты 3hi15 и 3hi17, специфичные для группы *Cytophaga-Flexybacter-Bacteroides*.

Разнообразие 2-гидрокси-изомеров ЖК позволяют селективно определить и вычислить количество микроорганизмов, содержащих сфинголипиды. Это, например, *Alcaligenes* (2h14) – их концентрации мала в пробах себума, но на порядок больше в глубинных слоях кожи.

Концентрация альдегидов в пробах себума на один-два порядка меньше, чем в крови. Отмечены маркеры бактерий рода *Propionobacterium* разветвленные альдегиды с длиной цепи 15 и 17 атомов углерода (i15a, a15a, i17a), *Bifidobacterium* (18:1ω9a), *Eubacterium* (18:1ω7a, 14a и i16a).

В интрепретации простых кислот меньше определенности, чем в случае с их гидроксильными производными, тем более что они являются в основном компонентами самого себума. Однако, на фоне стабильности состава себума можно полагать, что отмеченные индивидуальные отклонения в концентрации изо-кислот и специфичных для микробов изомеров мононенасыщенных ЖК вероятно связаны с изменением численности бактерий, колонизирующих кожу.

Разветвленные кислоты с числом атомов углерода, равным 13, скорее всего относятся к бациллам, i14 – к пептострептококкам и стрептомицетам, 14:1 ω5 - к *Streptococcus pneumonia* и *Clostridium*. Можно полагать, что значительную долю вклада в разветвленные кислоты i,a15; i,a17; i16 составляют бациллы, актинобактерии и коринебактерии. Более точное отнесение может быть получено в результате расчета с учетом наложения профилей микроорганизмов. Антеизо-нонадекановая кислота (a19) является мерой количества стафилококков.

Изомер гексадеценовой кислоты 16:1ω5 в данном случае следует отнести к руминококкам, а 16:1ω7t – к нокардиям. Обнаружены 10-метилразветвленные кислоты с 14, 15,16,17 и 18 атомами углерода в цепи, что однозначно указывает на присутствие микроорганизмов, содержащих миколовые кислоты – микобактерии, нокардии, родококки и другие. Таким образом, отнесение липидных компонентов к конкретным таксонам показывает, что на коже могут быть представлены бактерии, актинобактерии, микроскопические грибы и другие микроорганизмы, грамотрицательные и грамположительные, аэробные и анаэробные.

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

1. Выбор антибиотиков и коррекция лечения

При инфекционном типе предпочтение отдается антибактериальным средствам, из которых наиболее безопасны и хорошо переносятся антибиотики из группы макролидов, препараты фузидинового ряда и противомикотические средства. Их выбор должен быть индивидуальным и определяться активностью кожного процесса, качественным и количественным фоном условно-патогенной флоры, безопасностью препарата для данного возраста (51,52) Мазитова, 2006, 2001.

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

соответствии с выявленными агентами инфекции или дисбиоза) мы предоставляем лечащему врачу вместе с результатами анализа.

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

Из общих соображений, можно считать такой подход более рациональным по сравнению с тестированием резистентности клинического штамма *in vitro,* поскольку он, во-первых, редко является истинным или единственным агентом воспаления, а во-вторых – чувствительность *in vivo,* как известно, далека от чувствительности в чашке Петри. Точнее – микробное сообщество в состоянии биопленки при *quorum-sensing* игнорирует любые самые сильные антибиотики. По нашим данным пристеночная микробиота кишечника крыс устойчива к ударным дозам антибиотика при длительном пероральном введении. Опытные врачи это понимают и в качестве препаратов выбора при гнойно хирургических инфекциях, например, предлагают назначать аугментин, метронидазол и амикацин, хотя эта рекомендация логически мало связана с практикой преимущественного высевания стафилококка, клебсиелы или псевдомонад из клинического материала. Тем не менее, эти препараты оказываются эффективными. Метод МСММ объясняет, почему. Оказывается, что наиболее частыми агентами гнойных инфекций являются клостридии, эубактерии, другие анаэробы, а также актинобактерии, которые чувствительны к указанным препаратам.

Антибиотики не разрушают микробиоту кишечной стенки, как показывают опыты на крысах (35) (Дьяченко, 2006) и мониторинг антибиотикотерапии в клинике.

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

Eubacterium – родственные клостридиям микроорганизмы, являющиеся одними из основных обитателей кишечника. Условные патогены с развитой системой видов и штаммов с универсальными свойствами. Эубактерии участвуют в качестве основных агентов во многих воспалительных процессах и синдромах: воспаления неизвестной этиологии, себорея, атопический дерматит, кахексия, воспаление кишечника, глютеновая энтеропатия, воспаление десен, средиземноморская семейная лихорадка, Yang Xiao-xia's “mysteriuos disease”, синдром раздраженного кишечника, воспаление легких, бактеремия, хронический синусит, болезнь Крона, периодонтит, артрит, простатит, муковисцидоз, эндометрит, эндокардит, неспецифический вагинит, врожденный порок сердца и другие. Основными функции эубактерий в организме человека являются: образование водорода, высвобождение гистамина, биотрансформация желчных кислот, индуцирование продукции провоспалительных цитокинов и TNF-alfa, а также противовоспалительного цитокина IL-10 (как ЛПС или клеточные токсины Грам+ патогенов) и другие. Эубактерии чувствительны к клиндамицину, амоксиклаву или ампициллин-сулбактаму (36) . **Eubacterium lentum** известен как микроорганизм, ассоциированный с ректальным раком и продуцирующий хориогонадотропин-подобный имунореактивный материал (ACEVEDO, 1979). Известен также как агент септического артрита и синуситов.

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

По литературным данным амоксиклав, ампициллин-сулбактам (табл. 7) являются одними из эффективных препаратов в отношении C. ramosum (37).

Таблица 7 (Table 5 в первоисточнике)

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

TABLE 5. Susceptibilities of *C. perfringens*, *C. ramosum*, *C. innocuum*, *C. clostridioforme*, and American Type Culture Collection control strains to 11 antimicrobial agents

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

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

Однако даже при малых абсолютных концентрациях (до 3,8x10^7 клеток/мл в анализе) ***C. perfringens*** **нельзя недооценивать** в патологическом плане: этот микроб образует как минимум 12 идентифицированных токсинов и энтеротоксин. Мишени для основных токсинов – биологические мембраны в различных тканях. Поражения обуславливают ферментативные процессы, катализирующие гидролитическое расщепление и нарушение клеточной проницаемости с последующим отеком и автолизом тканей, характерными для газовой гангрены. Наиболее обширный список антибиотиков, эффективных в отношении клостридий и других анаэробов, представлен в работе Goldstein (38).

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

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

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

Если учесть, что до настоящего времени в некоторых руководствах по микробиологии, как и ранее (39) [Bergi, 8-th Ed.], род Bifidobacterium относят к семейству Actinomycetaceae, то окажется, что актиномицеты филогенетически близки традиционно известным представителям пристеночной микробиоты кишечника. Они повышают значимость микробиоты кишечника для организма хозяина, так как актиномицеты превосходят все прочие микроорганизмы по продукции антибиотиков и витаминов и обладают мощным ферментативным аппаратом. Высокая степень колонизации кишечника актиномицетами не выглядит необычным явлением, если иметь в виду, что они широко распространены в окружающей среде – почве, воде, воздухе, на внутренних стенах жилых и производственных помещений (40) [Andersen, 1997]. Их обитание в организме человека при таких обстоятельствах выглядит естественным. Действительно, в руководствах по клинической микробиологии отмечается обнаружение актиномицетов и родственных организмов, таких как Mycobacterium, Actinomadura, Propionibacterium, Actinomyces, Corynebacterium, Bifidobacterium в кишечнике и других органах человека. Там они фигурируют (в том числе и бифидобактерии) как участники инфекционных и воспалительных процессов (41 Mannual on Clinical Microbiology).

Однако патогенность актиномицетов, чувствительность к антибиотикам, способы

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

Ванкомицин и **амикацин** эффективны в случае участия в инфекционном процессе аэробных **актинобактерий: стрептомицетов, нокардий, родококков**, которые довольно часто включаются в микст-инфекцию обследованных нами больных (42) McNeil, 1990.

Родококки – факультативные внутриклеточные актинобактерии, способные персистировать и вегетировать в макрофагах и других клетках высших организмов, вызывая в конечном счете их разрушение. Результирующее действие родококков вызывает поражение тканей аналогичное микобактериям туберкулеза. (43) Linder, 1997. Они вырабатывают ферменты, гидролизующие липиды (например – холестеролоксидазу) которые токсичны для организма человека и животных. Биопсия тканей, пораженных родококками, выявляет многочисленные полиморфоядерные лейкоциты, вспученные клетки и каверны с внутриклеточными бактериями. Большинство штаммов родококков чувствительны к гликопептидным антибиотикам, включая ванкомицин и тейкопланин, и к рифампину. Макролиды, такие как эритромицин и кларитромицин также ингибируют рост многих штаммов. Родококки устойчивы к бета-лактамным (за исключением карбапенемов, особенно имипенема) антибиотикам, хотя это свойство не связано с продукцией бета-лактамазы. У имеющих контакт с домашними жи вотными нередко причиной пневмонии и распада легкого является Rodococcus equi. Поскольку это внутриклеточный патоген, антибиотик должен проникать внутрь клеток. В таких случаях длительно применяют комбинацию эритромицина (или других новых макролидов) с рифампицином

Propionibacterium freudenreichii - типовой вид рода Propionibacterium, грамположительных анаэробных или анаэротолерантных бактерий, продуцирующих при ферментации сахаров и молочной кислоты пропионовую и уксусную кислоты, а также двуокись углерода. Используется в качестве стартовой культуры при производстве сыров. Являются перспективным пробиотиком вследствие их способности ингибировать рост нежелательной микрофлоры, а также стимулировать рост бифидобактерий и ферментативную активность кишечника. В присутствии P. freudenreichii кишечные микробы создают мукоз повышенной плотности, способствующий размножению многочисленных видов микроорганизмов и физическому препятствию обменных процессов. В комбинации с P. aeruginosa и другими грамотрицательными микроорганизмами P. freudenreichii обуславливают накопление вязкой мокроты в легких при муковисцидозе, а при пиелонефрите, простатите и воспалениях верхних половых органов женщин снижают проходимость протоков и мембран (45) Осипов, 2007.

Таблица 8.

Чувствительность P. freudenreichii и Actinomyces viscosus к антибиотикам

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

Tetracycline	0.5–4	1	2

2. Применение пробиотиков и других корректоров микробиоты кишечника

Что касается действия сухих пробиотиков, то в практике терапии в ЦНИИГ положительная динамика в клиническом течении заболевания начинала появляться со 2–3-го дня лечения бифиформом, а дисбиотические изменения кишечника восстанавливались более медленно (21) Осипов, 2003. Вероятно, во-первых, одного пробиотика, даже бинарного и при десятикратной дозе не достаточно для быстрой стимуляции роста всех бактерий, находящихся в дефиците (тем более не входящих в состав пробиотика) (46) Парфенов, 2002. Во-вторых – довольно часто полярность изменения концентрации ключевых микробов оказывается в противофазе. Вы стимулируете бифидобактерии – а их и так оказывается избыток. Больной не отвечает на пробиотик. В третьих – на восстановление численности медленно растущих микробов требуется продолжительное время. Более перспективным выглядит применение жидких пробиотиков типа нормофлоринов, биовестинов или трилакта. В них на два порядка больше живых бактерий ($N=10^{10}$), да еще жидкая среда в качестве пребиотика. Конечно, и этого мало, чтобы восполнить недостаток или подрастить дефицитные лактобациллы или бифидобактерии – дело не в этом. Поскольку в кишечнике их порядка 10^{14} , то добавка пробиотика не восполняет дефицита по количеству клеток, но на самом деле клинический эффект достигается. Можно предположить, что живые культуры бифидо- и лактобактерий вместе с частью культуральной среды содержат биокаталитические вещества, стимулирующие восстановление не только этих, но и других микробов – то есть восстановление кишечного гомеостаза.

Нормализующее действие на нарушенную микробиоту кишечника оказывает синтетический тетрадекапептид гепон (47) Малахова, 2005;. В отличие от большинства известных иммуномодуляторов гепон обладает противовоспалительными свойствами, противовирусной активностью, способностью к активации местного иммунитета, повышению устойчивости слизистой оболочки к инфекциям. Уровень колонизации микроорганизмами тощей кишки возрастает до пяти раз в сравнении с исходным уровнем, что актуально для больных СРК, у которых дефицит микробиоты может быть семикратным по сумме микроорганизмов. Базовые кишечные микроорганизмы - эубактерии, бифидобактерии и клостридии достигают или превышают уровень нормы. Лактобациллы остаются ниже нормы, хотя их численность увеличивается на порядок по сравнению с первоначальной. По многим микробам - кокки, актиномицеты, энтеробактерии, грибы обнаруживается восстановление нормы или избыточный рост более чем на порядок (48) Парфенов, 2003.

Результаты количественного анализа широкого круга микроорганизмов кишечника в двух его отделах (тощая и ободочная) одновременно позволили выявить сложную картину

перестройки микробиоты в результате применения в качестве регулирующего средства – пробиотика энтерола, представляющего собой препарат дрожжей Saccharomyces boulardii. Сопоставление микробных профилей до и после курса лечения энтеролом показали, что в тонком кишечнике происходят изменения, одинаково направленные у всех обследованных в сторону восстановления нормальной микробиоты (49) Парфенов, 2006. Однако ее восстановления до уровня колонизации практически здоровых людей не происходит, несмотря на положительные результаты по клиническим показателям. Тенденций к специфическому воздействию энтерола на определенные микроорганизмы или их группы при этом не выявлено. Энтерол более активен по отношению к микроорганизмам тощей кишки по сравнению с толстой. Это проявляется в общем увеличении уровня колонизации при исходном дефиците микробиоты, а также в преимущественном росте количества отдельных видов микроорганизмов. В фекалиях изменения происходят хаотично, как в отношении общего содержания в них микроорганизмов, так и отдельных членов сообщества.

Препарат висмута ДеНол (висмута трикалия дицитрат), как оказалось, обладает воспроизводимым эффектом оптимизации общего уровня колонизации тощей кишки и концентрации отдельных микроорганизмов (50) Осипов. То есть нивелирование дисбактериоза в сторону нормы: уменьшение концентрации микробов, проявляющих избыточный рост, и увеличение численности дефицитных микробов. Так реагируют на ДеНол основные обитатели кишечника – бифидобактерии, эубактерии (E. moniliforme, E.nodatum, E.sabureum и пр.) а также пропионовые бактерии. К сожалению, исходный нормальный уровень лактобацилл в большинстве случаев понижается под действием препарата. Концентрации C. propionicum и C. hystoliticum при исходном низком уровне (на один-два порядка ниже нормы) после лечения увеличивают численность и достигают в ряде случаев нормального уровня. Численность C. difficile, как правило, уменьшается после лечения от 20% до шести раз. Численность актинобактерий (Actinomyces, Streptomyces, Nocardia), грибов и цитомегаловируса также имеет тенденцию к снижению. Заметно уменьшается количество энтерококков и стафилококков, изначально превышавших норму.

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

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

сопоставимой, информации о микробиоте человека в норме и патологии, а также и среди разных патологий.

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

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

Представление об инфекции. По устаревшему определению – инфекция есть размножение чужеродных организмов в теле организма-хозяина (22) Поздеев, 2001. Размножение нормальной микробиоты не рассматривается как инфекция. Измерения методом МСММ позволяет уточнить круг микроорганизмов, обитающих в теле человека в норме и не относить их к инфекции. Например, распространенные среди врачей и пациентов выражения о стафилококковой, стрептококковой и многих других «инфекциях» выглядят терминологически некорректными, так как маркеры этих микроорганизмов обнаруживаются в норме на коже, в моче, в крови, в мазках и биоптатах слизистых оболочек разных органов. Маркеры дрожжей кандида также присутствуют в норме повсеместно. По существу ничего не меняется в представлениях об инфекции. Необходима только терминологическая аккуратность как результат медицинского образования и образованности, а также медицинского просвещения населения. Кроме того, в приведенном выше определении отсутствует количественный фактор, который становится необходимым при использовании боле точного определения инфекции, которое дано академиком Воробьевым А.А., инфекции как избыточного роста микроорганизмов. Будет ли она патологически (клинически) значимой – зависит от количественной стороны процесса инфицирования органа. Для этого небходимо, чтобы возникла биопленка, прикрепленная к поверхности, чтобы число микробных клеток в ней превышало величину 10^3 для возникновения *quorum sensing* – обобщения генетической, трофической, энергетической и прочей коллективной активности микробного сообщества. В том числе токсической и патогенетической, если будут экспрессированы соответствующие гены.

Представления о патогенезе. Они тоже не меняются, если иметь в виду сведения, которые можно найти в научной литературе. К сожалению, они доходят до практического врача с большим запозданием. Поэтому, первое знакомство с результатами масс-спектрометрии выглядят неожиданными для тех, кто привык делить микроорганизмы на патогенные и непатогенные. На самом деле это деление можно характеризовать как условное. Данные масс-спектрометрии показывают, что патогенны (т.е. по определению – способны вызывать заболевание) все микроорганизмы. Пользуясь Интернет можно легко убедится, что это действительно так, что лактобациллы и бифидобактерии – патогенны, и порой опасны для жизни, если являются причиной септического состояния. Это принципиально важное для пациента расширение понятия патогенности, которое теоретически дает ему надежду на гарантированное излечение, если микробиологи возьмут под контроль не только десяток аэробных микроорганизмов, позволяющих себя легко культивировать в искусственных условиях, но и все анаэробы и актинобактерии. Сейчас хорошо известно, что организм человека населяют более 500 видов микробов (менее известно, что генетики уже выделили более 1000 фенотипов микробных ДНК). Получается, что сейчас в клинике контролируют рутинно только около 1% потенциальных патогенов. Поэтому лечение заболеваний микробной этиологии происходит по-существу эмпирически. Анализ запаздывает на неделю, время, необходимое для выявления вида микроорганизма культурально- биохимическим

методом. И при этом вероятность выявления истинного возбудителя ничтожно мала.
Это подтверждается клинической апробацией метода МСММ. Стафилококки, псевдомонады, представители семейства энтеробактерий (кишечная палочка, протей, клебсиела и прочие) редко выступают в роли доминант микробной ассоциации при воспалениях. Как правило ими являются анаэробы Clostridium, Eubacterium, Propionibacterium. Появляются публикации о доминировании видов Clostridium в кишечнике человека, обладающих широким спектром токсинов. И это логично, поскольку, даже по известным оценкам, без масс-спектрометрических уточнений, в организме человека доминируют анаэробы (от 80 до 95% по разным данным). Значит на долю аэробов приходится максимум 20%. Из них 17 % надо отнести к аэробным актиномицетам (актинобактериям). Отсюда следует, что аэробы, преимущественно контролируемые в настоящее время в клинических бактериологических лабораториях, - стафилококки, энтеробактерии сем Enterobacteriaceae, другие неферментирующие грамотрицательные микроорганизмы родов Pseudomonas, Stenotrophomonas, Acinetobacter и другие, реже фигурирующие в результатах посевов микробы составляют около 3% возможных агентов воспалений. Следует признать, что эта часть микробиоты не свойственна организму человека.

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

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

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

- Контроль за реакцией больного на принятую терапию – мониторинг и коррекция лечения

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. Burkhart C.N., Gottwald L. Assesment of etiologic agents in acne pathogenesis. //SKINmed.- 2003.- Vol.2. -№4.-P.83-92.
5. Burkhart CN and CG Burkhart Microbiology's principle of biofilms as a major factor in the pathogenesis of acne vulgari**s.** Int J Dermatol, December 1, 2003; 42(12): 925-7.
6. Cordain L. Lindeberg S., Hurtado M., Kim H et al. Acne vulgaris a disease of western civilization. //Arch Dermatol. – 2002.- Vol.138: P. 1584-1590.
7. Daniel F., Dreno B., Poli F., Auffret N. et al. Epidemiological study of acne insecondary school pupils in France, autumn 1996. Ann Derm Venerol 2000.- Vol.127.-P.273-278.
8. Healy E., Simpson N., Acne vulgaris. // British Medical Journal.- 1994.- Vol.308: P831-833.
9. Woodard I., Adolescent acne: a stepwise approach to management/ Topics in Advanced Practice Nursing Journal, 2002.- Vol.-№2. – P.10.
10. Адаскевич В.П. Сальные железы. Заболевания сальных желез // Акне вульгарные и розовые. – Москва: Медицинская книга, Н.Новгород: Издательство НГМА, 2003. – С.12-120.
11. Аравийская Е.Р., Красносельских Т.В., Соколовский Е.В. Акне // Кожный зуд. Акне. Урогенитальная хламидийная инфекция / Под ред.Соколовского Е.В. – Спб.: «Сотис», 1998.- С.68-110
12. Данилова А.А., Шеклакова М.Н. Акне. Русский Медицинский Журнал 2001; том 9, №11 (130): С.452-456.
13. Till A.E. Goulden V. Cunliffe W.J., Holland K.T. The cutaneous microflora of adolescent, persistent and late-onset acne patients does not differ // British Journal of Dermatology. – 2000.- Vol.142.- №5. – P.885-892.
14. Eady E.A., Cove J.H., Blake J., Holland K.T., et al. Recalcitranr acne vulgaris. Clinical, biochemical and microbiological investigation of patients not responding to antibiotic treatment. Br J Dermatol 1998; 139 (Suppl.52): 41-47.
15. Neubert U., Korting H.C., Susceptibillity of cutaneous propionibacteria to ciprofloxacin and seven antibiotics: comparative study of isolates from acne patients and healthy volunteers. // Acne and related disorders. Edit.: R.Marks and G. Plewig.- 1988: P.133-136.
16. Noble W.C. The skin microflora and microbial skin disease // Cambridge univ. press.-1993.- P.390.
17. Higaki S. and M Morohashi Characteristics of anaerobes from skin specimens. Drugs Exp Clin Res, January 1, 2003; 29(4): 153-5.
18. Brook I.. Secondary bacterial infections complicating skin lesions. J. Med. Microbiol. -- Vol. 51 (2002), P.808-812.
19. Bjorksten B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. J Allergy Clin Immunol. 2001 Oct; 108(4): P.516-20
20. Волкова Л. А., Халиф И. Л., Кабанова *И. Н.* Влияние дисбактериоза кишечника на течение вульгарных угрей. Клиническая медицина №6 2001**.**

21. Осипов Г.А., Парфенов А.И., Верховцева Н.В., Ручкина И.Н., Курчавов В.А., Бойко Н.Б., Рогатина Е.Л. Клиническое значение исследования микроорганизмов слизистой оболочки кишечника культурально-биохимическим и хромато-масс-спектрометрическим методами. Эксп. Клин. Гастроэнтерология, 2003; (4): 59-67.
22. Поздеев О.К. Медицинская микробиология. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001, стр. 123.
23. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. В 3-х томах. Том 1.; Микрофлора человека и животных и ее функции. Стр 14-17. М., Грант, 1998.
24. Митрука Б.М. Применение газовой хроматографии в микробиологии и медицине. М. Медицина, 1978.
25. Chemical Methods in Bacterial Systematics (1985) (Goodfellow, M. and Minnikin, D.E., Eds.), Acad. Press, London – Toronto
26. Stead, D.E., Sellwood, J.E., Wilson, J., Viney, J. Evaluation of a commercial microbial identification system based on fatty acid profiles for rapid, accurate identification of plant pathogenic bacteria. J.Appl.Bacteriol. 1992, 72, 315-321.
27. Турова Е.С., Осипов Г.А. Изучение структуры микробного сообщества, активного в биотрансформации минералов железа в каолине. Микробиология, 1996, 65(5), 682-689.
28. Osipov G.A., Turova E.S. Studying species composition of microbial communities with the use of gas chromatography-mass spectrometry. Microbial community of kaolin. FEMS Microbiol.Rev. – 1997. - Vol. 20. - P. 437-446.
29. Осипов Г.А. Демина А.М. Хромато-масс-спектрометрическое обнаружение микроорганизмов в анаэробных инфекционных процессах. Вестник РАМН. -1996. Т.13, №2, с.52-59
30. Белобородова Н.В., Осипов Г.А.. «Гомеостаз малых молекул микробного происхождения и его роль во взаимоотношениях микроорганизмов с организмом хозяина». //Вестник Российской академии медицинских наук.-1999.-№7.-С.25-31.
31. Т.А. Крымцева, Г.А. Осипов, Н.Б. Бойко, Я.А. Соколов, А.М. Демина, Т.В. Радюшина, Д.Г. Осипов. Минорные жирные кислоты биологических жидкостей урогенитальных органов и их значимость в диагностике воспалительных процессов. Журн. Микроб. Эпидем. Иммун. 2003, № 2: 92-101.
32. Кцоян Ж.А., Н.В.Белобородова, Г.А.Осипов, Н.Н.Саркисян, К.Г.Карагезян. Спектр и уровень содержания низкомолекулярных соединений микробного происхождения при периодической болезни. Вестник РАМН, №2, с.41-45, 2002.
33. 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.
34. Кабаева Т.И. Использование адапалена в комплексном лечении больных выльгарными угрями под контролем микрофлоры кожи и состава кожного сала. //Дисс… канд.мед.наук.-М., 2005.-114с
35. Дьяченко И.А, Осипов Г.А., Архипова А, Захарова Л, Мурашев А.Н. Изучение влияния ампициллина на микробиоту кишечника у крыс методом газовой хроматографии – масс спектрометрии по маркерным веществам в крови. Третья международная конференция из серии "Наука и бизнес" 19 - 21 июня 2006 г., Пущино.
http://www.rusbio.biz/ru/nb2006_06.shtm
36. In Vitro Activities of Ramoplanin, Teicoplanin, Vancomycin, Linezolid, Bacitracin, and Four Other Antimicrobials against Intestinal Anaerobic Bacteria. Antimicr.Agents.Chemoter., July 2003, p. 2334–2338 Vol. 47, No. 7
37. J.Clin.Microbiol., Dec. 1995, p. 3209–3215 Vol. 33, No. 12)

38. Goldstein E. J. C., Citron D. M., C. V. Merriam, Y. Warren, K. L. Tyrrel. Comparative In Vitro Activities of Ertapenem (MK-0826) against 1,001 Anaerobes Isolated from Human Intra-Abdominal Infections. Antimicr.Agents.Chemoter., Sept. 2000, p. 2389–2394
39. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.// Baltimore,London.- Wilians&Wilkins.- 1984
40. 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.
41. Manual of Clinical Microbiology. 5-th ed. Editor in Chief - Albert Balows. Washington, 1991
42. 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
43. Linder R. *Rhodococcus equi* and *Arcanobacterium haemolyticum*: Two "Coryneform" Bacteria Increasingly Recognized as Agents of Human Infection. Emerging Infectious Diseases Vol. 3, No. 2, April–June 1997
44. Goldstein E. J. C., Citron D. M., C. V. Merriam, Y. Warren, K. L. Tyrrel. Comparative In Vitro Activities of ABT-773 against Aerobic and Anaerobic Pathogens Isolated from Skin and Soft-Tissue Animal and Human Bite Wound Infections. Antimicr.Agents.Chemoter., Sept. 2000, p. 2525–2529
45. 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.
46. Парфенов А.И., И.Н.Ручкина, Г.А.Осипов. Антибиотикоассоциированная диарея и псевдомембранозный колит. Болезни кишечника, Том 04/N 6/2002
47. Малахова Н.С., Пичугин А. В., Халиф И.Л., Атауллаханов Р.И. Применение иммуномодулятора Гепон для лечения неспецифического язвенного колита Фарматека, 2005, № 6[101], с.105-108
48. Парфенов А.И., Ручкина И.Н. Активатор местного иммунитета Гепон в комплексной терапии дисбиотических нарушений кишечника // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2003. № 3. С. 66-69
49. Парфенов А.И., И.Н.Ручкина, Г.А.Осипов. Коррекция микрофлоры кишечника пробиотиками у больных антибиотико-ассоциированной диареей. Consilium Medicum, Справочник поликлинического врача. Том 04/N2/2006 http://www.consilium-medicum.com/magazines/polik/handbook/article/9919
50. Осипов Г.А., Парфенов А.И., Ручкина И.Н. Висмута трикалия дицитрат в лечении больных постинфекционным синдромом раздраженного кишечника. Русский медицинский журнал http://www.rmj.ru/articles_5556.htm
51. Мазитова, Л. П. Аллергические заболевания кожи в детском возрасте. Лечащий врач, 2006, №1, http://www.lvrach.ru/2006/01/4533294/
52. Мазитова Л.П. Современные аспекты патогенеза и лечения аллергодерматозов у детей. РМЖ, Том 9 № 11, 2001 457-461