

УДК 57.083.332

Определение микрoэкологического статуса и диагностика инфекций организма человека с использованием метода хромато-масс-спектрометрии

**Е.Г. Струкова, А.А. Ефремов*, А.А. Гонтова,
Г.А. Осипов, Н.И. Сарматова**
*Сибирский федеральный университет,
Россия 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79¹*

Received 16.11.2009, received in revised form 7.12.2009, accepted 15.12.2009

Показана возможность использования метода хромато-масс-спектрометрии для оценки микрoэкологического статуса организма человека по масс-спектрометрии микробных маркеров, в качестве которых выступают жирные кислоты, стерины, альдегиды. По анализу жирных кислот методом ХМС можно количественно определять наличие 57 микроорганизмов в ротовой полости человека.

Ключевые слова: микрoэкологический статус, метод определения микрoэкологического статуса, ГХ-МС-метод.

Применяемые на сегодняшний день в клинической практике методы определения микрoэкологического статуса организма человека, а также диагностики инфекций имеют определенные ограничения и недостатки. Например, существенным недостатком классического бактериологического исследования, помимо дороговизны и длительности (7-10 дней), является невозможность оценить роль некультивируемых микроорганизмов, прежде всего анаэробов в инфекционно-воспалительном процессе. Используемый в качестве дополнительного к классическому иммуно-серологический метод не прямой, поскольку выявляет не возбудителя, а иммунный ответ на него, который может иметь индивидуальные вариации.

Известные молекулярно-биологические методы, при несомненных преимуществах - прямое определение возбудителя, высокие специфичность и чувствительность, универсальность, скорость, возможность диагностики хронических и латентных инфекций, - имеют такие серьезные недостатки, как частые ложноположительные результаты и невозможность адекватной количественной оценки [1].

Из всего вышесказанного вытекает очевидная востребованность в надежном количественном экспресс-методе диагностики дисбактериозов и определения возбудителей инфекции. Такими свойствами обладает метод масс-спектрометрии микробных маркеров (МСММ), основанный на количе-

* Corresponding author E-mail address: AEfremov@sfu-kras.ru

¹ © Siberian Federal University. All rights reserved

ственном определении маркерных веществ микроорганизмов (жирных кислот, альдегидов, спиртов и стерина) непосредственно в клиническом материале [1-3]. В этом принципиальное отличие метода, придающее ему качественно новое свойство – возможность разложения суперпозиции всего пула микробных маркеров, что позволяет оценить вклад от каждого из сотен видов микроорганизмов, которые обитают, например, в кишечнике. Метод является высокочувствительным, быстрым (2,5 ч на полный цикл исследования), универсальным, экономичным и имеет широкий диагностический спектр. Внедрение ГХ-МС дает возможность сократить время и стоимость исследования, минуя стадии повторных пересевов первичных колоний и тестовых ферментаций, которые особенно сложны, трудоемки и длительны для анаэробов. Метод позволяет не только определять маркерные вещества (жирные кислоты, альдегиды, спирты и стерина) в чистых культурах микроорганизмов, выделенных из клинического материала по известной технологии, но и количественно устанавливать состав микробного сообщества, который кроется за набором маркеров конкретной пробы. Материалом для исследования служат любые биологические жидкости (кровь, слюна, моча, ликвор и т.д.) [2].

К настоящему времени состав жирных кислот большинства микроорганизмов изучен, показана его воспроизводимость, доказана их родо- и видоспецифичность. Метод детектирования микроорганизмов по ЖК-маркерам сходен с генетическим анализом (ПЦР, определение последовательности нуклеотидов 16sРНК и пр.), поскольку состав жирных кислот детерминирован в ДНК и воспроизводится путем репликации участка генома транспортными РНК и последующего

синтеза ЖК в митохондриях по матричным РНК. Другими словами, профиль ЖК так же консервативен, как и строение ДНК. Исследования в области бактериальной палеонтологии подтвердили постоянство состава ЖК отдельных микроорганизмов и пула их жирных кислот, в целом, с глубины времен в 2,5 млрд лет.

В данной работе мы продемонстрируем возможности метода ХМС для оценки микрoэкологического статуса и диагностики инфекций организма человека на примере мазка ротовой полости человека.

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

Наиболее часто встречающиеся в клинических пробах ЖК альдегиды и стерина перечислены в табл. 1 с отнесением к вероятным таксонам микроорганизмов [1-2].

Аналогичные зависимости обнаружены для гидроксикислот, спиртов, альдегидов и стерина [1, 2, 4, 5].

Метод МСММ был применен нами для оценки микрoэкологического статуса человека по количественному определению индивидуальных микробных сообществ ротовой полости практически здоровых лиц юношеского возраста обоего пола. Полученные в ходе исследования результаты сравнивались с аналогичными показателями баз данных, включающих сведения о составе жирных кислот штаммов бактерий, вирусов и микроскопических грибов [6, 7]. Материалом для исследования служили

Таблица 1. Высшие жирные кислоты в составе клеточной стенки с отнесением к микроорганизмам, у которых они наиболее часто встречаются*

№	Обозначение**	Название	Микроорганизмы
Жирные кислоты			
1	C10	Декановая	<i>Streptococcus</i>
2	i11	Изоундекановая	<i>Stenotrophomonas</i> ,
3	C12:0	Лауриновая	<i>Arcobacter</i> ,
4	iC12	Изолауриновая	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
5	iC13	Изотридекановая	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Bacillus subtilis</i> ,
6	a13	Антеизотридекановая	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Brevibacterium</i>
7	13:0	Тридекановая	<i>Selenomonas</i>
8	i14	Изомиристиновая	<i>Streptomyces</i> , <i>Bacillus</i> , <i>актинобактерии</i>
9	14:1Δ9	9,10- тетрадеценная	<i>Clostridium</i> , <i>Streptococcus pneumonia</i>
10	14:1Δ11	11,12-тетрадеценная	<i>Simonsiella</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Kingella kingae</i>
11	14:0	Миристиновая	<i>Lactobacillus</i> , <i>Helicobacter</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Clostridium</i>
12	2Me14	2-метил-тетрадекановая	<i>Mycobacterium gordonae</i>
13	i15:1	Изопентадеценная	<i>Flavobacterium</i>
14	15:1Δ9	9,10-пентадеценная	<i>Clostridium propionicum</i> , <i>Bacteroides hypermegas</i>
15	i15	Изопентадекановая	<i>Propionibacterium</i> , <i>Bacteroides</i>
16	a15	Антеизопентадекановая	<i>Staphylococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>коринеформные бактерии</i>
17	15:0	Пентадекановая	Большинство видов микроорганизмов, минорный компонент, <i>Selenomonas</i> , <i>Clostridium sporogenes</i> , <i>Bacteroides succinogenes</i> , <i>Bact. ruminicola</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i>
18	i16:1	Изогексадеценная	<i>Desulfovibrio</i>
19	16:1Δ7	7,8-гексадеценная	<i>Clostridium ramosum</i> , <i>Streptococcus</i>
20	16:1Δ9	9,10-гексадеценная	Большинство видов микроорганизмов
21	16:1Δ11	11,12-гексадеценная	<i>Ruminococcus</i>
22	i16:0	Изопальмитиновая	<i>Streptomyces</i> , <i>Nocardiosis</i> ,
23	10Me16	10-метилгексадекановая	<i>Rhodococcus</i>
24	16:0	Пальмитиновая	Большинство видов микроорганизмов
25	i17:1	Изопентадеценная	<i>Campylobacter mucosales</i>
26	17:1	Гептадеценная	<i>Mycobacterium</i> , <i>Candida albicans</i>
27	i17:0	Изогептадекановая	<i>Bacillus</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Prevotella</i>
28	a17:0	Антеизогептадекановая	<i>Corynebacterium</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Nocardiosis</i> , <i>Nocardia</i>
29	17сус	Циклогептадекановая	сем. <i>Enterobacteriaceae</i>
30	17:0	Гептадекановая	Большинство видов микроорганизмов, минорный компонент
31	18:4	Октадекатетраенная	Некоторые грибы и дрожжи
32	18:3	Линоленовая	Грибы и дрожжи
33	18:2	Линолевая	Грибы, дрожжи, простейшие
34	18:1Δ9	Олеиновая	Все организмы
35	i18:1 Н		<i>Enterococcus faecalis</i>
36	18:1Δ11	Цис-вакценная	<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Cardiobacterium hominis</i>
37	18:0	Стеариновая	Многие микроорганизмы

38	i18	Изооктадекановая	<i>Peptostreptococcus, Bifidobacterium, Nocardiosis, Bacillus subtilis, Clostridium difficile</i>
39	10Me18	10-метил-октадекановая, (туберкулостеариновая)	pp. <i>Mycobacterium, Nocardia</i> ; вв. <i>Corynebacterium bovis, C. гр. xerosis, C. urealyticum,</i>
40	11Me18:1	11-метилоктадеценная	<i>Afipia, Helicobacter mustelae</i>
41	19сус	Циклононадекановая	<i>Lactobacillus, Enterococcus, Pseudomonas, Brucella, Campylobacter, сем. Enterobacteriaceae, Helicobacter pylori</i>
42	i19	Изононадекановая	<i>Bacillus subtilis, Bacteroides hypermegas</i>
43	a19	Антеизононадекановая	<i>Staphylococcus</i>
44	19:0	Нонадекановая	<i>Nitrobacter, Bacillus, Serratia; Burkholderia cepacia</i>
45	i19:1	Изо-нонадеценная	<i>Afipia</i>
46	20:1	Эйкозеновая	<i>Propionibacterium jensenii, Streptococcus thermophilus, St. salivarius, St. mutans, Actinomyces</i>
47	20:0	Эйкозановая	<i>Actinomyces</i>
48	20:1Δ11	11-эйкозеновая	<i>Streptococcus mutans</i>
49	21:0	Бегеновая	<i>Francisella</i>
50	22:6	Докозагексенная	грибы, эукариоты
51	22:0	Докозановая	<i>Francisella</i>
52	C22:4	Арахидоновая кислота	Простейшие и высшие организмы
53	24:0	Тетракозановая	<i>Francisella, Mycobacterium,</i> микроэукариоты
54	25:0	Пентакозановая	Микроэукариоты
55	26:0	Гексакозановая	<i>Mycobacterium,</i> микроэукариоты

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

** Обозначения веществ: 17:1 - 17- число атомов углерода, цифра после двоеточия - число двойных связей; a,i - в начале означает разветвление.

мазки со слизистой зева, взятые у 19 клинически здоровых людей в возрасте 18-20 лет. Материал собирали стерильным ватным тампоном, помещали в транспортную угольную среду Эймса и доставляли в лабораторию не позднее 24 ч. При подготовке к хромато-масс-спектрометрическому анализу пробу на ватном тампоне высушивают с добавлением равного по объему количества метанола и подвергают кислоту метанолизу в 1М HCl в метаноле. Метанолиз проводят в 0,4 мл реактива на 10 –15 мг сухого остатка в течение 1 ч при 80 °С. На этой стадии происходит освобождение жирных кислот и альдегидов из сложных липидов микроорганизмов и других клеток жидкости в виде

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

Хроматограмма жирных кислот и других продуктов жизнедеятельности микробных сообществ приведена на рисунке, а ее обработка в пересчете на индивидуальные микробы – в табл. 2.

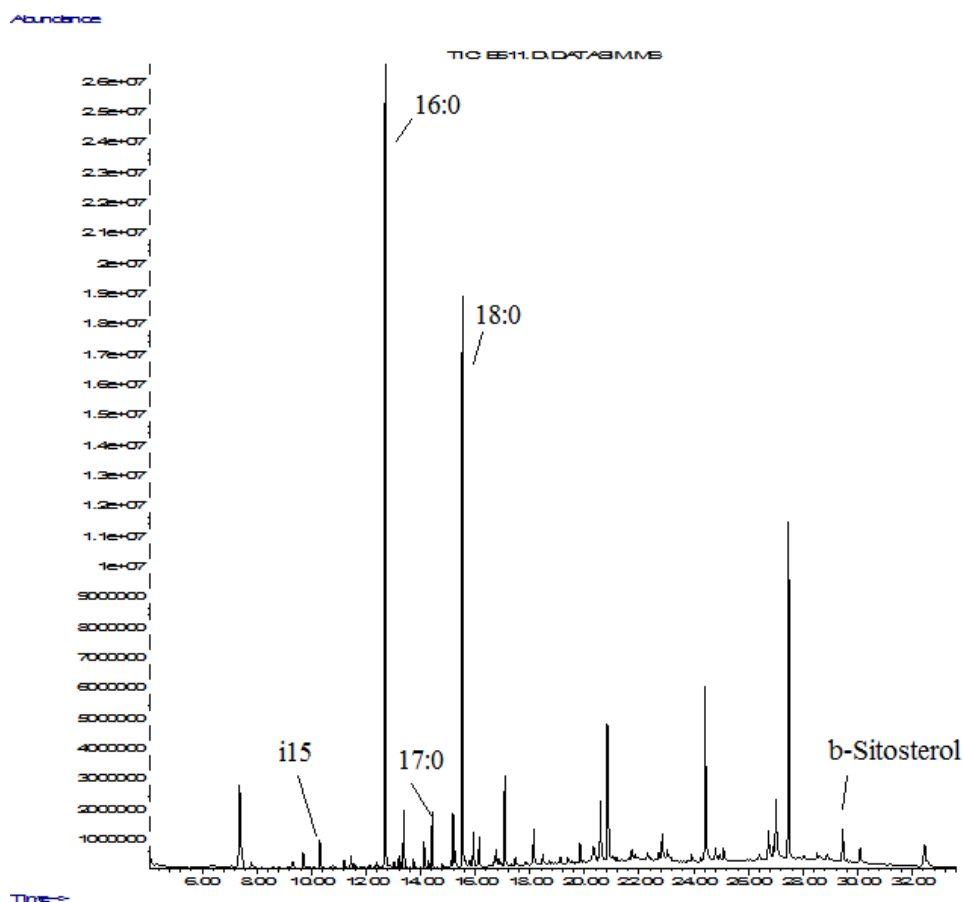


Рис. Типичная хроматограмма жирных кислот мазка ротовой полости здорового человека по выделенным ионам

По результатам проведенной серии анализов установлено, что нормальная микрофлора ротовой полости здоровых молодых людей возраста 18-20 лет, проживающих в Красноярске, выглядит следующим образом: преобладают такие группы микроорганизмов, как *Streptococcus*, *Mycobacterium/Candida*, *Actinomyces viscosus*, микроскопические грибы, ситостерол.

По литературным данным общая обсемененность микробных сообществ должна составлять $6168 \text{ кл/г} \cdot 10^5$. А по результатам полученных экспериментов практически у 16 пациентов значение общей обсемененности превышает эту величину в 2 раза, варьирует от 6807 до $16233 \text{ кл/г} \cdot 10^5$.

Интересно отметить, что после курса масляных ингаляций 3 %-м пихтовым маслом картина микрофлоры через 2 ч воздействия изменилась, отмечено существенное подавление роста *Streptococcus*, *Clostridium ramosum*, *Lactobacillus*, *Clostridium perfringens*, *Nocardia asteroides*, цитомегаловируса, микра грибов, ситостерола, *Actinomycetes 10Me14*. Неизменным осталось количество *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium/Str. Pneumonia*, *Cl.difficile*, *Prevotella*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus mutans*, *Herpes*, *E.lentum 7741 (эрунна В)*, *Actinomyces viscosus*.

Из полученных результатов можно сделать вывод, что эфирное масло нормализует

Таблица 2. Результаты исследования микробных маркеров в мазке зева методом хромато-масс-спектрометрии, проба до и после обработки эфирным маслом

№	Микроорганизм	кл/гх10*5	
		После ингаляции	До ингаляции
1	Streptococcus	201	222
2	Eubacterium lentum (группа А)	0	0
3	Bacillus cereus	0	0
4	Peptostreptococcus anaerobius	57	74
5	Clostridium/Str. pneumonia	37	13
6	Nocardia, 14:1d11	0	0
7	Peptostreptococcus anaerobius	0	0
8	Moraxella/Neisseria	10	0
9	Pseudomonas aeruginosa	14	18
10	Propionibacterium	0	0
11	Bacillus megaterium	0	0
12	Clostridium propionicum	70	58
13	Stenotrophomonas maltophilia	0	0
14	Selenomonas	0	0
15	АКТИНОМИЦЕТЫ	62	77
16	Pseudonocardia	42	56
17	Streptomyces	61	25
18	Clostridium ramosum	200	613
19	Fusobacterium/Haemophytus	13	14
20	Alcaligenes	20	22
21	Петер	0	0
22	Flavobacterium	0	0
23	Rhodococcus	331	345
24	Staphylococcus intermedius	28	36
25	Porphyromonas	0	0
26	Corineform CDC-group XX	286	282
27	Lactobacillus	1200	1405
28	Campylobacter mucosalis	0	0
29	Mycobacterium/Candida	560	620
30	E.coli	0	0
31	Eubacterium moniliforme sbsp	0	0
32	Cl.difficile	212	209
33	Actinomadura	0	0
34	Prevotella	78	33
35	Eubacterium moniliforme, E.nodat	0	980
36	Bacteroides fragilis	0	0
37	Staphylococcus	192	180
38	Bifidobacterium	0	0
39	Helicobacter pylori, h18	112	67
40	Clostridium perfringens	513	892
41	Enterococcus	201	175
42	Eubacterium	31	21
43	Propionibacterium freudenreichii	0	0
44	Streptococcus mutans	431	434
45	Herpes	65	65
46	Микр грибы, кампестерол	77	64
47	Nocardia asteroides	43	93
48	Цитомегаловирус	133	246
49	Микр грибы, ситостерол	1356	5618
50	Propionibacterium acnes	0	0
51	Ruminococcus	0	0
52	Actinomycetes 10Me14	113	123
53	E.lentum 7741 (группа В)	14	42
54	Enterococcus	0	0
55	Actinomyces viscosus	1372	1372
56	Eubacterium spp.	0	0
57	Afpia, Helicobacter mustelae	0	0
	Сумма	8137	14493

микрофлору ротовой полости, в отличие от антибиотиков не угнетает общий рост микрофлоры, действует более мягко, не раздражая слизистую [8, 9].

Проведенная оценка микрофлоры зева здоровых лиц юношеского возраста показала широкий диапазон аэробных и анаэробных микроорганизмов, общее количество которых превышает норму, принятую для здоровых людей средней полосы России. Следовательно, метод газовой хроматографии – масс-спектрометрии позволяет

изучить видовой состав микроорганизмов, населяющих микробиоценозы человека различных биосубстратов. Полученные результаты исследования состава микробных маркеров в мазке зева практически здоровых лиц юношеского возраста дадут возможность использовать эти данные в качестве контрольных значений в дальнейших исследованиях, а также решать вопросы профилактики, выявляя носительство патогенной микрофлоры и формируя группы риска по развитию определенных заболеваний.

Работа выполнена при финансовой поддержке НИР № 1.3.09, проводимой по заданию Федерального агентства по образованию.

Список литературы

1. Минорные жирные кислоты биологических жидкостей урогенитальных органов и их значимость в диагностике воспалительных процессов / Крымцева Т.А., Осипов Г.А., Бойко Н.Б., Соколов Я.А., Демина А.М., Радюшина Т.В., Осипов Д.Г. // Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии. 2003. № 2. С. 92-101.
2. Осипов Г.А., Парфенов А.И., Верховцева Н.В., Ручкина И.Н. и др. Клиническое значение исследования микроорганизмов слизистой оболочки кишечника культурально–биохимическим и хромато–масс–спектрометрическим методами // Эксперим. и клинич. гастроэнтерология. 2003. №4. С.59–62.
3. Митрука Б.М. Применение газовой хроматографии в микробиологии и медицине. М.: Химия, 1980. 256 с.
4. Осипов Г.А. Способ определения родового (видового) состава ассоциации микроорганизмов // Патент РФ № 2086642. С12N 1/00, 1/20, С12Q 1 /4. Приоритет от 24 дек.1993 г.
5. Осипов Г.А., Демина А.М. Хромато-масс-спектрометрическое обнаружение микроорганизмов в анаэробных инфекционных процессах // Вестник РАМН. 1996. Т.13. №2. С. 52-59.
6. Воробьев А.А. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии: учебник. М., 2001. 224с.
7. Koroch A.R., Juliana H.R. Bioactivity of essential oils and their components // Flavours and Fragrances. 2005.
8. Стецюк О.У. Зависимость фармакодинамических параметров антибиотиков от условий определения чувствительности бактериальных возбудителей внебольничных и госпитальных инфекций: дисс. ... канд. биол. наук. Смоленск, 2000.
9. Хуснутдинова Л.М. Микрофлора слизистой оболочки миндалин человека в норме при патологии // Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии. 2006. №1. С.60-63.

Definition of the Microecological Status and Diagnosis of the Human's Infections, using the Method of Chromatography-Mass Spectrometry

**Elens G. Strukova, Alexandr A. Efremov,
Anna A. Gontova, Georgiy A. Osipov and Natalia I. Sarmatova**
*Siberian Federal University,
79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041 Russia*

It was shown the possibility of using the method of chromatography-mass spectrometry to estimate microecological status of the human by the method of mass spectrometry microbial markers, which are mainly fatty acids, sterols, aldehydes. For analysis of fatty acids by CMS it is possible quantify the presence of 57 microorganisms in the human oral cavity.

Keywords: microecological status, method of mass spectrometry microbial markers, GC-MS-method.
