

# Микроэкологический статус кандидатов на пересадку печени

В.В. Киселев<sup>1</sup>, О.И. Андрейцева<sup>1</sup>, Н.Б. Бойко<sup>2</sup>, Г.А. Осипов<sup>2</sup>, Н.Ф. Федосова<sup>3</sup>, К.В. Лядов<sup>3</sup>

<sup>1</sup>НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского; <sup>2</sup>Академическая группа акад. РАМН Ю.Ф. Исакова (при НЦССХ им. А.Н.Бакулева); <sup>3</sup>Лечебно-реабилитационный центр Росздрава РФ, Москва

Контакты: Владимир Валерьевич Киселев [eloim@mail.ru](mailto:eloim@mail.ru)

Метод определения микст-инфекции, дисбиозов и воспалительных процессов по специфическим маркерам (жирные кислоты, альдегиды и стеролы) с помощью хромато-масс-спектрометрии применен для исследования микроэкологического статуса больных — кандидатов на пересадку печени. В одном опыте в течение 3 ч с момента поступления проб в лабораторию по молекулярным маркерам количественно определены разнообразные микроорганизмы (аэробы, анаэробы, актинобактерии, грибы, вирусы). Обнаружено, что у обследованных чаще наблюдается избыточный рост грамположительных анаэробов (кlostридии, зубактерии), актинобактерий родов *Streptomyces*, *Nocardia* и дрожжей *Candida*. Далее по ранжире следуют стафилококки, стрептококки и грамотрицательные микроорганизмы группы *Moraxella/Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori* и *Fusobacterium/Haemophilus*. Выбор антибиотиков и пробиотиков для коррекции дисбиоза и инфекции осуществляли с учетом данных литературы. Скорость и точность методики обеспечивает оперативный мониторинг процесса лечения под контролем масс-спектрометрии.

**Ключевые слова:** трансплантация печени, микроэкология, дисбактериоз газовая хроматография, масс-спектрометрия, жирные кислоты, микробные маркеры, анаэробная инфекция, кlostридии, зубактерии

## The microecological status of candidates for liver transplantation

V.V. Kiselev<sup>1</sup>, O.I. Andreitseva<sup>1</sup>, N.B. Boiko<sup>2</sup>, G.A. Osipov<sup>2</sup>, N.F. Fedosova<sup>3</sup>, K.V. Lyadov<sup>3</sup>

<sup>1</sup>N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Care, Moscow;

<sup>2</sup>Acad. of the Russian Academy of Medical Sciences Yu.F. Isakov (A.N. Bakulev Research Center of Cardiovascular Surgery);

<sup>3</sup>Therapeutic Rehabilitation Center, Russian Agency for Health Care, Moscow

A method for identifying mixed infections, dysbioses, and inflammatory processes from specific markers (fatty acids, aldehydes, and sterols) by chromatographic mass spectrometry was used to study the microecological status of patients eligible for liver transplantation. Heterogeneous microorganisms (aerobes, anaerobes, actinobacteria, fungi, and viruses) were quantified from molecular markers in an experiment within 3 hours after the samples were sent to the laboratory. The examinees were found to have excessive growth of gram-positive anaerobes (*Clostridia*, *eubacteria*), actinobacteria of the genera *Streptomyces*, *Nocardia*, and *Candida* yeasts. Next were staphylococci, streptococci, and gram-negative microorganisms of the group *Moraxella/Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, and *Fusobacterium/Haemophilus*. Antibiotics and probiotics were chosen to correct dysbiosis and infection, by taking into account the data available in the literature. The speed and accuracy of the procedure ensure real-time monitoring of a treatment process under control of mass spectrometry.

**Key words:** liver transplantation, microecology, dysbacteriosis, gas chromatography, mass spectrometry, fatty acids, microbial markers, anaerobic infection, *Clostridia*, *eubacteria*

### Введение

Одним из последствий стрессовых воздействий на организм человека является нарушение, порой устойчивое, обмена веществ в организме, возникшее из-за изменения микрофлоры кишечника и ассоциированной с ним проницаемости кишечной стенки. В результате появляется диспропорция в поступлении биологически активных веществ, продуцируемых микроорганизмами, в организм хозяина и происходит нарушение нормального функционирования его органов. Последствия могут быть патологическими, поскольку от микробиоты кишечной стенки зависит продукция более половины необходимых для человека витаминов, ферментов, факторов, сигнальных молекул, медиаторов и других гормоноподобных соединений, требуемых для обеспе-

чения метаболизма и репродукции его собственных клеток и систем — иммунной, нервной, эндокринной и др. Пептидогликан клеточных стенок грамположительных микроорганизмов (они составляют абсолютное большинство пристеночной микробиоты кишечника человека) активно участвует в регуляции иммунного статуса хозяина на местном и системном уровнях. Считается, что именно микроэкологические изменения в организме хозяина являются запусковым механизмом подавляющего большинства патологических процессов, и существует столько же вариантов дисбаланса микробиоценозов человека, сколько известно нозологических форм заболеваний [1].

В связи с этим микроэкологический статус человека, точнее, поддержание его гомеостаза, являет-

ся необходимым условием стабильного функционирования всех его органов и систем. Соответственно, одним из первых этапов в реабилитации людей, переживающих стресс при серьезном хирургическом вмешательстве, коим является трансплантация органов, должен быть контроль и восстановление микробиоценоза, если он оказался нарушенным.

На основании того что микробиота человека состоит преимущественно из анаэробов, решением перечисленных выше проблем является учет анаэробов в этиологии дисбактериоза и инфекции с соответствующей модификацией антибиотикотерапии и коррекцией микробиоты пробиотиками [2, 3].

Новое направление в молекулярной микробной диагностике — определение микст-инфекции, дисбиозов и воспалительных процессов по специфическим маркерам (жирные кислоты, альдегиды и стеролы) с помощью хромато-масс-спектрометрии позволяет быстро и надежно выявлять малые доли веществ микробного происхождения в любых биологических средах организма человека. Этот метод микробиологического исследования быстр и универсален, поскольку не требует выращивания отдельных микроорганизмов на специальных средах и проведения для каждого из них специальных биохимических тестов для установления вида возбудителя [4, 5]. Точное количественное определение микроорганизмов способствует назначению целенаправленной антибактериальной терапии и оперативному контролю ее эффективности. Метод масс-спектрометрии, в отличие от применяемого в обычной практике посева клинического материала на культуральные среды, дает информацию о «замаскированной» части микст-инфекции, состоящей из некультивируемых в условиях лабораторий клинической микробиологии микроорганизмов.

Обнаруженный в результате систематических исследований гомеостаз микробных маркеров в крови [6, 7] и адекватность его профиля составу кишечной микробиоты здорового человека обеспечили уникальную возможность мониторировать состояние микробиоты кишечника малоинвазивным экспрессным методом — по анализу крови [8]. В связи с тем что в кровь попадают также липидные компоненты других отмирающих микроорганизмов, его можно считать экспрессным методом определения микробиологического статуса высших организмов. Это не означает, что микробы сами присутствуют в крови. В кровь из зоны локализации микробов (кишечника, органов дыхания и т.п.) попадают специфические маркеры, причем концентрация соответствующего маркера в крови пропорциональна содержанию микроба в организме человека. По этой причине специфический маркер и его концентрация в крови являются эквивалентом наличия в организме определенного микроба и его содержания соответственно.

**Цель исследования** — попытка подтвердить и дополнить известные из предыдущих исследований сведения о микроэкологии больных с серьезными заболеваниями печени, а также описать ее становление после трансплантации с помощью метода масс-спектрометрии микробных маркеров.

#### **Материалы и методы**

Режим анализа подробно описан ранее в литературе [4, 5]. Вкратце он состоит в следующем. Кровь в количестве 0,04 мл подвергали кислому метанолизу в 0,4 мл 1 М HCl в метаноле в течение 1 ч при температуре 80°C. В результате реакции метанолиза жирные кислоты, входящие в состав сложных липидов, освобождаются в виде метиловых эфиров. Их двукратно экстрагировали 200 мкл гексана, высушивали и обрабатывали в 20 мкл N,O-бис(триметилсилил)-трифторацетамида в течение 15 мин при температуре 80°C для получения триметилсилильных эфиров гидроксикислот. Смесь эфиров в количестве 2 мкл вводили в инжектор ГХ-МС системы HP-5973 («Аджилент Технолоджис», США). Для управления и обработки данных использовали штатные программы прибора. Хроматографическое разделение пробы осуществляли на капиллярной колонке с метилсиликоновой привитой фазой HP-5ms («Хьюлет-Паккард»). Длина колонки 25 мм, внутренний диаметр 0,25 мм. Режим анализа — программированный, скорость нагрева термостата колонки 5°/мин в диапазоне 130–320°C.

Площади пиков маркеров на масс-фрагментограммах интегрировали автоматически по заданной программе. Затем эти данные вводили в программу расчета, подготовленную в электронных таблицах Excel. Для количественного расчета использовали данные калибровки по дейтерированной тридекановой кислоте и чистым культурам клинических изолятов микроорганизмов.

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

Метод не требует использования биологических и биохимических тестовых материалов — культуральных сред, ферментов, тестовых субстратов, праймеров и характеризуется следующими показателями:

- определение > 50 микроорганизмов одновременно в одном анализе;
- универсальность в отношении разных групп микроорганизмов (бактерии, грибы, вирусы);
- время анализа — 2,5 ч;
- чувствительность  $10^3$ – $10^4$  клеток в пробе;
- селективность — до вида при наличии маркера;
- анализ непосредственно в материале без посева и выращивания.

Материалом исследования были пробы крови 41 пациента из «листа ожидания» трансплантации печени. Причиной возникновения терминальной печеночной недостаточности у большинства обследованных был цирроз печени. При анализе селективных хроматограмм систематически фиксировали в крови обследованных пациентов маркеры 47 таксонов (роды или виды) микроорганизмов, включая некоторые группы грибов и вирусов.

### Результаты

Результаты измерения концентраций микробных маркеров в крови с последующей реконструкцией микробного сообщества позволили определить изменение общего микробиологического статуса больного, а также состав микст-инфекции в очаге поражения (табл. 1).

В соответствии с выработанным ранее статистическим критерием [7] отклонения от нормы приобретают клиническую значимость в том случае, когда численность микроорганизмов изменяется вдвое по сравнению с нормой. В табл. 1 полосы потемнее отражают регулярный избыточный рост бактерий в организме, а светло-серые – дефицит.

По экспериментальным данным, изменения носят как общий, так и индивидуальный характер (см. табл. 1). Наблюдается избыточный рост ряда микроорганизмов из состава нормальной микробиоты хозяина, что по определению свидетельствует о наличии инфекции. Общим признаком этой части пациентов является более чем двукратное превышение концентраций маркеров, кластридий группы *Clostridium ramosum*, *Eubacterium lentum* (*Eggerella lenta*), видов *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Helicobacter pylori* и актинобактерий *Streptomyces*, *Nocardia*. Наибольший прирост численности бактерий приходится на *Clostridium ramosum*, *Eubacterium lentum*, *Helicobacter pylori* и актинобактерий *Streptomyces*, *Nocardia*. К частным признакам относят увеличение численности основной группы эубактерий (*Eubacterium moniliforme*, *Eubacterium nodatum*, *Eubacterium sabureum*), *Fusobacterium/Haemophilus*, кластридий группы *Clostridium Perfringens*, дрожжей *Candida* а также стафилококков и оральных стрептококков, отмечающееся не у всех пациентов. Частично участвуют в инфекционном процессе пептострептококки, анаэробные стрептококки *Streptococcus mutans*, *Propionibacterium jensenii*, виды *Achromobacter*. Грамотрицательные микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* (*Enterobacteriaceae Coli*, *Proteus*, *Klebsiella* и другие, имеющие общие маркеры в ранге семейства) обнаружены в избыточном росте только у 4 пациентов. Число других выявленных грамотрицательных бактерий, таких как представители родов *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Neisseria*, *Bacteroides*, *Burkholderia*, *Francisella*, не превышало уровня клинической значимости или предела детектирования. У 19 больных отмечен общий избыточ-

ный рост микробиоты по оценке микробиологического статуса, у остальных пациентов ( $n=22$ ) – снижение его по сравнению с нормой из-за дефицита лактобацилл, бифидо-, эу- и пропионобактерий.

Таким образом, изменения в микробиологическом статусе пациентов – кандидатов на пересадку печени проявляются в увеличении численности одной группы бактерий (инфекция, воспаление) и снижении – другой.

Подробные количественные данные, полученные с помощью метода масс-спектрометрии микробных маркеров, позволяют выявить микробные доминанты потенциальных агентов инфекции. Они служат объективной основой для тактики дальнейшего ведения больного с целью выбора средств подавления инфекции. Действительно, как показано на примере анализов одного и того же больного до и после лечения, это удастся осуществить. В качестве примера можно привести коррекцию дисбактериоза у одного из больных (рис. 1).

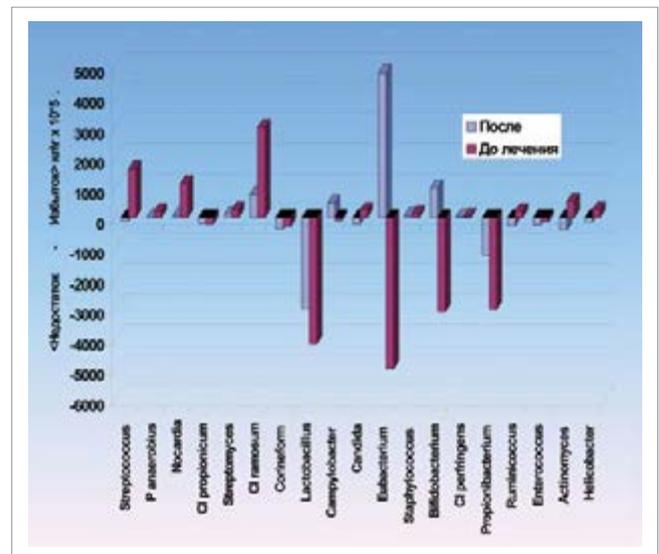


Рис. 1. Коррекция дисбактериоза

До лечения у больного обнаружен избыток *Clostridium ramosum*, стрептококков, нокардий и *Actinomyces viscosus* при существенном недостатке основных микроорганизмов нормальной микробиоты кишечника – лактобацилл, бифидо-, эу- и пропионобактерий. После лечения, включавшего применение жидких концентратов бифидо- и лактобактерий, микробиологический статус в основном нормализовался, за исключением того что содержание лактобацилл не достигло нормы, а численность эубактерий перешла в избыток. При восстановлении нарушенного микробиологического статуса оказалось полезным применение иммуномодуляторов (гепон, иммуномакс), препаратов висмута (Де-Нол), а также метронидазола, который, как оказалось, кроме подавления внедренных в слизистую оболочку бактероидов, стимулирует рост всех микроорганизмов нормальной микробиоты кишечника.

Таблица 1. Результаты анализа микробиологического статуса пациентов – кандидатов на пересадку печени (n=41) в сравнении с нормой

Микроорганизм	Норма, кл/мл x 10 <sup>-5</sup>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Streptococcus	249	1853	499	107	398	70	937	0	195	282	1315	367	106	0	345	551	408	0	486	310	390
Eubacterium lentum	68	174	344	670	387	381	162	316	336	483	497	732	545	577	542	135	414	232	407	167	809
Bacillus cereus	23	59	76	25	13	6	36	0	14	20	39	8	45	30	0	28	0	24	28	19	41
Peptostreptococcus anaerobius	0	217	366	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	107	0	0	0	0	0
Clostridium histolyticum	95	58	0	20	0	0	67	0	0	19	0	0	0	51	7	39	50	53	13	0	0
Nocardia, 14:1d11	262	1393	1450	321	830	308	1307	211	182	519	1526	416	1722	1532	318	579	633	375	1133	54	1119
Moraxella/Acinetobacter	0	1	4	6	1	16	0	0	0	12	2	7	4	21	15	0	19	0	2	1	2
Pseudomonas aeruginosa	0	2	9	3	6	8	0	5	5	4	4	4	6	0	24	77	5	18	9	5	4
Streptomyces	62	309	300	350	368	126	216	127	170	242	463	220	361	283	217	157	139	181	398	57	539
Clostridium ramosum	2000	4985	5594	5545	3846	2112	3281	2975	3335	4824	5010	2499	4739	10386	2701	3790	5558	3868	11156	2115	4271
Fusobacterium/Haemophilus	0	0	4	5	0	11	1	7	5	0	11	8	11	185	19	7	7	6	7	7	7
Alcaligenes	48	17	83	23	0	43	5	38	39	41	45	54	47	108	64	39	29	35	72	59	91
Rhodococcus	423	345	375	566	486	576	345	424	484	723	536	589	451	1273	725	409	519	554	609	493	1112
Corinebacterium	605	311	456	464	574	230	323	228	270	645	588	319	541	779	290	216	234	292	604	111	718
Lactobacillus	6613	2440	5523	7176	7196	4952	2948	6009	6342	7298	8604	5950	6885	16072	4825	4563	5791	6660	13167	5665	10135
Campylobacter mucosalis	99	0	345	404	116	632	29	28	27	23	59	60	51	102	63	25	72	29	71	25	75
Candida	549	793	2828	254	1102	560	740	371	476	1339	1383	496	1018	1666	439	496	535	386	1515	219	1377
Enterobacteriaceae (E.coli и др.)	0	6	0	0	0	0	0	0	0	74	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Clidifficile	385	198	785	85	436	215	215	322	318	404	446	417	436	748	355	252	219	280	385	175	585
Prevotella	38	22	102	0	16	0	9	63	56	60	60	61	79	703	69	53	41	50	49	51	86
Eubacterium spp	6912	1892	9159	24031	5886	13444	2578	13326	15596	9992	7725	15484	10188	20465	12418	5059	12164	10993	18502	16727	17786
Bacteroides fragilis	0	0	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Staphylococcus	120	237	357	319	354	220	154	165	177	425	374	353	361	630	279	170	223	224	333	114	512
Bifidobacterium	5067	1972	2915	8611	1188	3629	1593	7249	278	5883	4166	1104	7786	9787	4825	3539	6266	3209	4221	4846	5982
Helicobacter pylory	14	23	74	59	14	28	6	23	40	38	45	50	47	212	59	36	33	39	41	53	55
Clostridium perfringens	12	30	77	11	25	15	9	15	16	23	39	26	42	46	19	16	21	16	164	31	39
Enterococcus	290	421	2297	144	547	426	207	222	349	418	580	376	601	704	276	300	357	0	0	254	767
Eubacterium	59	12	244	0	0	0	3	0	12	14	15	18	18	18	15	7	10	8	13	18	15
Propionibacterium spp	4480	1454	3585	7113	6119	4554	1387	3800	4418	5294	5035	5002	4357	5804	7053	2379	4326	1998	3640	1589	5885
Streptococcus mutans	229	332	409	676	272	327	103	322	219	550	415	378	322	821	237	339	389	426	710	339	703
Herpes	59	7	247	15	0	0	0	0	27	0	15	14	47	60	22	0	12	8	23	41	46
Nocardia asteroides	274	329	614	699	582	345	278	482	544	955	861	804	583	1165	530	266	629	401	995	306	592
Цитомегаловирус	166	31	88	7	63	13	5	0	25	9	12	15	18	41	490	146	14	10	107	66	26
Микр грибки	384	218	814	44	260	168	46	13	138	330	91	879	204	413	142	32	135	247	117	272	1442
Ruminococcus	640	855	1051	1338	1029	544	816	695	559	961	1571	1392	708	3350	518	367	509	713	4187	687	3868
Butyrivibrio/Cl. fimetarium	0	75	123	196	0	0	0	0	0	65	0	0	0	0	12	5	0	0	0	0	0
Actinomyces viscosus	1190	1731	1003	1159	934	896	255	1184	733	899	1242	1135	1527	2233	791	1125	1164	717	811	545	1205

Таблица 1. (Окончание)

Микроорганизм	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	
Норма, кл/мл x 10 <sup>-5</sup>	NT- 5852	NT- 5853	NT- 5867	NT- 5875	NT- 5876	NT- 5883	NT- 5921	NT- 5930	NT- 5933k	NT- 5934	NT- 5951	NT- 5962	NT- 5947	NT- 5977	NT- 5984	NT- 5986	NT- 6022	NT- 6071	NT- 6072	NT- 6101	NT- 6111	
Streptococcus	249	288	487	133	165	217	704	493	641	126	196	165	198	1244	117	207	212	208	0	75	176	96
Eubacterium lentum	68	454	414	315	295	96	186	171	156	94	111	26	46	147	305	189	345	131	220	311	314	113
Bacillus cereus	23	15	14	4	14	16	34	40	20	0	16	3	0	33	0	21	18	31	39	0	69	34
Peptostreptococcus anaerobius	0	0	0	0	0	0	0	0	45	0	0	1	0	80	0	0	0	1	0	0	0	0
Clostridium histolyticum	95	0	0	0	0	39	78	21	7	0	24	15	4	7	0	0	0	27	57	0	66	0
Nocardia, 14:1d11	262	763	456	1008	548	66	605	1311	905	773	448	567	140	847	307	719	711	1058	694	628	826	181
Moraxella/Acinetobacter	0	10	6	7	0	0	26	3	2	2	11	6	5	11	10	8	12	11	4	10	12	0
Pseudomonas aeruginosa	0	7	0	8	0	0	13	5	9	4	5	2	3	5	8	5	4	7	0	14	4	0
Streptomycetes	62	302	211	351	211	346	287	66	201	0	179	74	67	212	167	345	200	172	68	240	455	37
Clostridium ramosum	2000	4330	2980	3357	3242	5906	6086	2355	4007	4489	3420	997	1875	1733	2791	4526	3322	3564	2371	2354	8647	2922
Fusobacterium/Haemophilus	0	10	5	9	0	1	18	5	7	4	4	4	6	9	7	8	9	2	14	13	0	0
Alcaligenes	48	75	49	47	0	0	62	31	41	28	23	14	20	20	46	37	28	48	9	42	52	0
Rhodococcus	423	362	385	1389	197	229	692	1060	430	365	776	392	105	262	724	422	1561	426	1080	292	987	324
Corinebacterium	605	452	313	560	176	146	427	170	243	112	159	117	75	199	253	298	349	273	241	360	615	168
Lactobacillus	6613	5877	4969	6505	4162	4378	5675	4008	3819	6463	5370	2598	1469	1925	4759	6273	4357	4648	6273	4467	8068	3401
Campylobacter mucosalis	99	24	26	66	9	34	90	119	15	0	22	17	5	12	28	18	172	30	26	8	80	289
Candida	549	785	469	1940	372	719	1116	1269	673	709	497	503	213	381	476	696	1285	615	1150	544	1416	367
Enterobacteriaceae (E.coli и др.)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	77
Cl.difficile	385	440	315	478	199	217	447	315	175	506	134	181	58	188	389	285	337	248	326	375	598	310
Prevotella	38	70	54	53	14	10	65	16	46	0	18	27	16	38	54	37	27	44	18	194	41	0
Eubacterium spp	6912	7169	11156	3498	1934	2555	2326	2260	4009	4875	1724	94	220	2721	4129	3670	1866	1385	4541	4060	9049	8102
Bacteroides fragilis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Staphylococcus	120	295	208	452	154	147	400	274	199	95	102	161	47	162	251	231	339	230	260	189	150	82
Bifidobacterium	5067	5006	4509	2207	995	1324	1450	1178	2040	1509	437	206	515	2329	2811	2026	2380	1263	1785	2743	4045	1809
Helicobacter pylori	14	47	32	41	1	5	75	17	17	17	11	12	15	17	34	27	26	33	7	44	75	40
Clostridium perfringens	12	20	14	19	5	5	66	30	37	89	17	9	35	20	242	78	184	32	11	94	17	15
Enterococcus	290	351	343	591	221	313	655	558	324	282	209	235	92	197	319	448	534	367	640	299	655	329
Eubacterium	59	10	11	13	0	0	9	10	14	0	0	0	5	9	11	12	10	5	3	15	0	0
Propionibacterium spp	4480	4945	3658	2413	828	769	1901	1386	1290	724	1070	312	913	1933	2956	1539	3412	1012	2312	3003	4753	1190
Streptococcus mutans	229	180	224	411	75	172	357	305	412	249	390	128	57	99	182	291	291	328	160	4374	410	247
Herpes	59	23	27	76	0	0	18	0	15	0	3	0	0	0	0	6	0	8	0	0	122	133
Nocardia asteroides	274	963	622	689	376	160	583	521	465	0	0	212	105	258	426	1184	1705	683	0	746	892	203
Цитомегаловирус	166	20	10	13	0	15	31	17	15	17	7	5	7	6	13	8	106	6	40	40	15	16
Микр грибы	384	190	133	171	25	13	40	149	571	171	43	104	85	68	72	607	494	329	76	98	44	97
Ruminococcus	640	1609	659	1548	1177	1427	542	1315	668	2176	1065	595	319	495	439	1227	439	874	1573	884	1408	248
Butyrivibrio/Cl. fimetarium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	2	0	0	2	19
Actinomyces viscosus	1190	814	775	687	355	495	1174	391	735	366	320	216	278	368	745	904	583	737	596	542	1272	779

Примечание. Данные в размерности [клеток/мл x 10<sup>5</sup>]. Серым цветом выделены случаи изменения численности микроорганизмов в 2 раза по сравнению с нормой, темно-серым – превышение нормы в 2 раза, светло-серым – уменьшение ниже двукратного уровня.

В пробах обследованных пациентов отсутствуют маркеры, характерные для бактериоидов, немногочисленны и другие привычные для диагностической практики анаэробы – пептострептококки. Однако выявлены редко культивируемые кишечные анаэробы – виды *Eubacterium*, *Propionibacterium*, кластридии группы *Clostridium ramosum*, а также многочисленные аэробы во главе с оральными стрептококками. Что касается *Clostridium perfringens*, то даже при малых абсолютных концентрациях этот микроб нельзя недооценивать в патологическом плане: он 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 аутолизом тканей, характерными для газовой гангрены.

Ниже представлено описание клинического случая.

**Больная А., 57 лет.** Диагноз: цирроз печени вирусной этиологии (HCV + HBV), класс А по критериям Чайлда – Пью, портальная гипертензия, гепатоспленомегалия.

Первичный анализ микробиологического статуса, выполненный в апреле 2007 г., показал дефицит основных компонентов нормальной микрофлоры: эу- (*Eubacterium moniliforme*, *Eubacterium nodatum*, *Eubacterium sabureum*), бифидо- и пропионобактерий при избыточном росте (инфекции) актинобактерии родов *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Nocardia*, а также *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella/Acinetobacter*, *Helicobacter pylori*, *Fusobacterium*, *Eubacterium lentum*, стафилококков, руминококков и дрожжей *Candida* (табл. 2). При повторном обследовании, проведенном в августе того же года, обнаружено увеличение общего дефицита колонизации на 30% при росте численности стрептококков, бацилл, *Clostridium perfringens* и *Clostridium propionicum*. В то же время уменьшилось содержание части условно-патогенной микрофлоры: анаэробных пептострептококков, моракселл, стафилококков, фузобактерий, хеликобактера. После трансплан-

тации произошло резкое снижение численности нормальной микрофлоры (в 4 раза по сравнению с нормой) до уровня колонизации кишечника, наблюдаемой при синдроме раздраженной кишки [8]. При этом выше нормы осталось количество нокардий, возросла численность группы *Moraxella/Acinetobacter* и появились бактерии семейства *Enterobacteriaceae* (*Enterobacteriaceae coli*, *Proteus*, *Klebsiella* и др.) общей численностью на уровне 10<sup>6</sup> клеток/мл.

На рис. 2 наглядно видно снижение численности основных групп микроорганизмов кишечника – лактобацилл, бифидобактерий, кластридий, эу-, пропионобактерий и других, а также возвращение их к нормальному уровню в процессе реабилитации.

### Коррекция дисбактериоза

Для коррекции дисбиоза перспективным представляется применение жидких пробиотиков типа нормофлоринов или биовестинов. В них на два по-

**Таблица 2.** Коррекция микробиологического статуса пациентов под контролем масс-спектрометрии микробных маркеров в процессе цикла первичный анализ – коррекция перед операцией трансплантации печени – контроль после операции – восстановление нарушенной микрофлоры

Микроорганизм	Норма, кл/мл x 10 <sup>5</sup>	NT-5867	NT-5921	NT-5951	NT-6071
		Первичный анализ	Коррекция	После операции	Восстановление
Streptococcus (оральные)	249	133	493	165	0
Eubacterium lentum	68	315	171	26	220
Bacillus cereus	23	4	40	3	39
Clostridium hystolyticum	95	0	21	15	57
Nocardia, 14:1d11	262	1008	1311	567	694
Peptostreptococcus anaerob	0	20	0	0	0
Moraxella/Acinetobacter	0	7	3	6	4
Pseudomonas aeruginosa	0	8	5	2	0
Clostridium propionicum	288	0	201	7	218
Актиномицеты	77	107	84	25	88
Streptomyces	62	351	66	74	68
Clostridium ramosum	2000	3357	2355	997	2371
Fusobacterium/Haemophyl	0	9	5	0	2
Alcaligenes	48	47	31	14	9
Rhodococcus	423	1389	1060	392	1080
Lactobacillus	6613	6505	4008	2598	6273
Mycobacterium/Candida	549	1940	1269	503	1150
Enterobacteriaceae (E.coli и	0	0	0	35	0
Prevotella	38	53	16	27	18
Eubacterium	6912	3498	2260	94	4541
Staphylococcus	120	452	274	161	260
Bifidobacterium	5067	2207	1178	206	1785
Helicobacter pylori	14	41	17	12	7
Clostridium perfringens	12	19	30	9	11
Enterococcus	290	591	558	235	640
Propionibacterium freudenii	4480	2413	1386	312	2312
Streptococcus mutans	229	411	305	128	160
Herpes	59	76	0	0	0
Nocardia asteroides	274	689	521	212	0
Цитомегаловирус	166	13	17	5	40
Ruminococcus	640	1548	1315	595	1573
Actinomyces viscosus	1190	687	391	216	596
Всего ...	30 248	31 126	21 308	8846	26 066

**Примечание.** Желтым цветом выделены показатели численности микроорганизмов, более чем вдвое превышающие норму (инфекция), а бирюзовым – вдвое ниже нормы – дефицит.

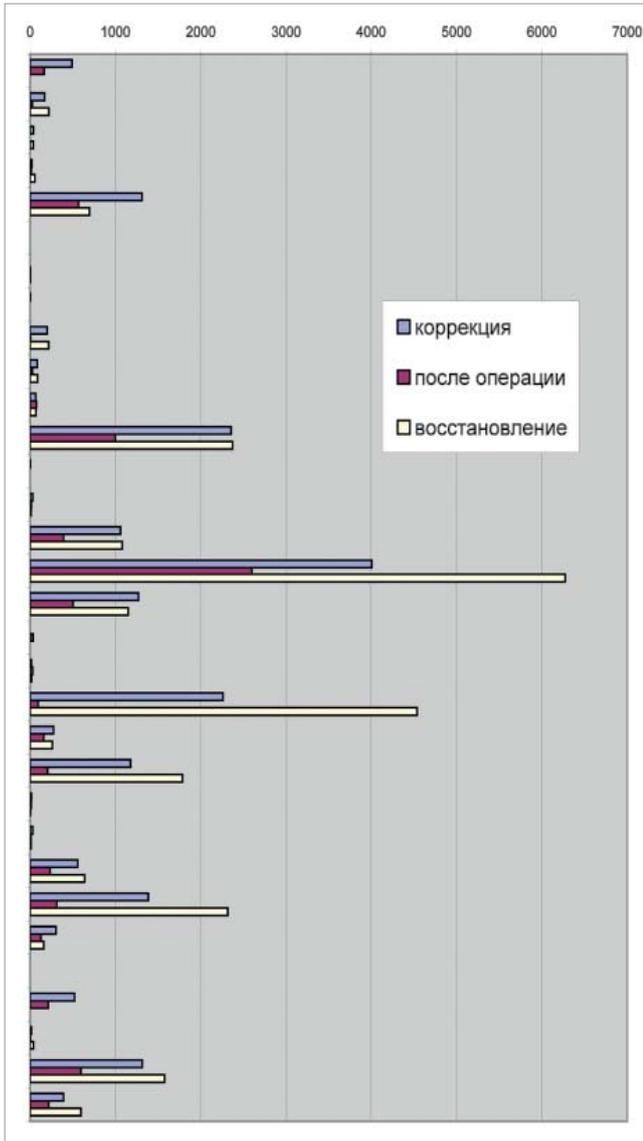


Рис. 2. Коррекция микроэкологического статуса пациентов

рядка больше живых бактерий ( $n=10^{10}$ ), кроме того, жидкая культуральная среда содержит естественный пул ростовых факторов микроорганизмов в качестве пребиотика. Конечно, этого мало для того, чтобы восполнить недостаток или подрастить дефицитные лактобациллы или бифидобактерии. Тем не менее, поскольку в кишечнике их содержание составляет примерно  $10^{12}$ , добавка пробиотика не восполняет дефицита по числу 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 – т.е. способствуют нормализации кишечного гомеостаза.

Нормализующее действие на нарушенную микробиоту кишечника оказывает синтетический тетрадекапептид гепон. В отличие от большинства известных иммуномодуляторов гепон обладает противовоспалительными свойствами, противовирус-

ной активностью, способностью к активации местного иммунитета, повышению устойчивости слизистой оболочки к инфекциям. Уровень колонизации микроорганизмами тощей кишки возрастает до 5 раз по сравнению с исходным, что актуально для пациентов с синдромом раздраженного кишечника, у которых дефицит микробиоты может быть 7-кратным по сумме микроорганизмов. Базовые кишечные микроорганизмы – эу-, 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.

Препарат висмута де-нол, как оказалось, обладает воспроизводимым эффектом оптимизации общего уровня колонизации тощей кишки и концентрации отдельных микроорганизмов. Таким образом, происходит нивелирование дисбактериоза в сторону нормы: уменьшение концентрации микробов, проявляющих избыточный рост, и увеличение численности дефицитных микробов. Так реагируют на де-нол основные обитатели кишечника – бифидо-, эу- (*Eubacterium moniliforme*, *Eubacterium nodatum*, *Eubacterium sabureum* и пр.), а также пропионовые бактерии. К сожалению, исходный нормальный уровень лактобацилл в большинстве случаев понижается под действием препарата.

Лишь у 1 из 41 пациента в крови был обнаружен высокий титр маркера цитомегаловируса. С учетом опасности, которую представляет цитомегаловирусная инфекция после трансплантации печени и начала иммуносупрессии, пациенту был проведен курс лечения валганцикловиром. При последующем исследовании крови маркер определяться перестал.

#### Обсуждение

Всего найдено 43 таксона микроорганизмов, маркеры которых имеют клинически значимое (более чем в 2 раза) превышение нормы (см. 1-й столбец табл. 1 слева), т.е. могут являться участниками инфекционного процесса. Потенциальная инфекция носит полимикробный характер. У разных пациентов одновременно клинически значимыми могут быть до 24 таксонов микроорганизмов из числа контролируемых. Ведущими микроорганизмами в количественном отношении являются анаэробы (уровень до  $10^9$  клеток/мл). Это клостридии *Clostridium ramosum* и *Clostridium perfringens*, эубактерии *Eubacterium moniliforme*, *Eubacterium nodatum*, *Eubacterium sabureum*, *Eubacterium lentum* и руминококки. Все они составляют нормальную (индигенную) микробиоту организма человека. Им сопутствует группа кокковых бактерий: стафило-, стрепто-, энтерококки – которые обычно выявляют при классическом бактериологическом исследовании.

Их уровень  $10^7$ – $10^8$  клеток/мл. Выше нормы концентрация микроскопических грибов *Candida*, актинобактерий *Streptomyces*, *Nocardia*, *Rhodococcus* и других, численность которых также составляет  $10^7$ – $10^8$  клеток/мл. Минорная группа по численности (но не по значимости) представлена грамотрицательными микроорганизмами: *Moraxella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Fusobacterium* (альтернативно *Haemophilus*), *Alcaligenes* и *Helicobacter pylori*. Микробный эквивалент концентрации их маркеров в крови имеет порядок  $10^6$  клеток/мл.

Из экспериментальных данных следует, что при измерении микробных маркеров в крови выявляется новая группа микроорганизмов из числа трудно культивируемых и поэтому мало известных в клинической практике. Эти участники инфекционного процесса – клостридии, зубактерии, лактобациллы, хеликобактеры, стрептомицеты, родококки – обладают высокой патогенетической активностью. Она известна благодаря специфически связанным с этими организмами нозологиям, каждая из которых воспринимается сама по себе как серьезное заболевание, трудно поддающееся лечению. Клостридии групп перфрингенс и рамозум (группа RIC – *ramosum*, *inocuum*, *clostridioforme*) – это гангрена, зубактерии – септический артрит, *Helicobacter pylori* – язвенная болезнь желудка, языка и атеросклероз; стрептомицеты и другие актинобактерии – туберкулез, нокардиозы и актиномикозы.

В крови 14 из 41 пациента мы обнаружили высокую концентрацию маркеров зубактерий. *Eubacterium* – родственные клостридиям микроорганизмы, являющиеся одними из основных обитателей кишечника. Эти условные патогены с развитой системой видов и штаммов, обладающие универсальными свойствами. Для них характерно индуцирование продукции провоспалительных цитокинов и фактора некроза опухоли- $\alpha$ , а также противовоспалительного цитокина интерлейкин-10 (липополисахарид – ЛПС или клеточные токсины Грам<sup>+</sup>-патогенов). Это обуславливает их участие в развитии патологии тяжелых заболеваний, таких как средиземноморская семейная лихорадка, эндокардит, врожденный порок сердца, кожные и кишечные патологии, связанные со сложным изменением концентрации их видов в биотопах. *Eubacterium lentum* – микроорганизм, ассоциированный с ректальным раком и продуцирующий хоригонадотропинподобный иммунореактивный материал [9]. Он также является возбудителем септического артрита и синуситов.

*Helicobacter pylori* – микроорганизм хорошо известный своим участием в микробной этиологии язвенной болезни, в последнее время обнаруживается и в других органах – полости рта, печени, прямой кишке, атеросклеротических бляшках. На этом фоне выявление *Helicobacter pylori* в других отделах пищеварительного тракта в норме и патологии не выгля-

дит странным. Патогенность *Helicobacter pylori* известна: проникая через слизь, бактерии прикрепляются к эпителиальным клеткам и поступают в железы слизистой оболочки. ЛПС микроорганизмов способствует миграции нейтрофилов и развитию острого воспаления. Под действием бактериальной уреазы мочевины превращается в аммиак, повреждающий слизистую оболочку.

*Родококки* – факультативные внутриклеточные бактерии, способные персистировать и вегетировать в макрофагах и других клетках высших организмов, вызывая в конечном счете их разрушение. Результирующее действие родококков обуславливает поражение тканей аналогичное микобактериям туберкулеза [10]. Они вырабатывают ферменты, гидролизующие липиды (например, холестеролоксидазу), которые токсичны для организма человека и животных. При биопсии тканей, пораженных родококками, выявляются многочисленные полиморфоядерные лейкоциты, вспученные клетки и каверны с внутриклеточными бактериями. Большинство штаммов родококков чувствительны к гликопептидным антибиотикам, в том числе ванкомицину, тейкопланину, и рифампину. Макролиды, такие как эритромицин и кларитромицин, также ингибируют рост многих штаммов. Родококки устойчивы к  $\beta$ -лактамам (за исключением карбапенемов, особенно имипенема) антибиотикам, хотя это свойство не связано с продукцией  $\beta$ -лактамазы. У людей, имеющих контакт с домашними животными, нередко причиной пневмонии и распада легкого является *Rodococcus equi*. В связи с тем что это внутриклеточный патоген, антибиотик должен проникать внутрь клеток. В таких случаях длительно применяют комбинацию эритромицина (или других новых макролидов) с рифампицином.

На наш взгляд, приведенные данные подтверждают существующее суждение о патогенетическом участии в инфекционном процессе микроорганизмов кишечника [11, 12], заполняя тем самым пробелы в представлении о том, какие именно таксоны микроорганизмов в нем участвуют, в каком количественном выражении и как часто. Авторы также надеются, что эта информация послужит поводом для расширения понятия «эндотоксикоз» [13, 14] при наличии инфекции в области хирургического вмешательства путем включения в число продуцентов токсинов грамположительных бактерий – основных обитателей кишечника: зубактерий, лактобацилл, клостридий, пропионо- и актинобактерий в первую очередь. Популяции этих бактерий, так же как и все прочие микроорганизмы, при избыточном росте (инфекции) с наибольшей вероятностью вырабатывают токсигенные штаммы и провоспалительные факторы. Известно, что анаэробы являются основными обитателями организма человека. Участие анаэробов в раневой инфекции и сепси-

се не вызывает сомнений, а доля этого участия приближается, по данным многочисленных работ, к их доле в микроэкологическом статусе человека [12]. В ходе проведения эмпирической антибиотикотерапии также подтверждено участие анаэробов и актинобактерий, поскольку эффективным лечение ста-

новится тогда, когда в препараты выбора включены амоксилав (действующий на клостридии и эубактерии) с метронидазолом, а также амикацин, к которому чувствительны практически все актинобактерии [15].

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т. 1. М.: Грант, 1998.
2. Белобородова Н.В., Хабиб О.Н. Антибактериальная терапия инфекционного эндокардита. *Анн хир* 1999;6: 67–77.
3. Хабиб О.Н., Белобородова Н.В. Роль анаэробов в этиопатогенезе инфекционного эндокардита. *Инфекц бол* 2004;2:74–81.
4. Осипов Г.А., Демина А.М. Хромато-масс-спектрометрическое обнаружение микроорганизмов в анаэробных инфекционных процессах. *Вестн РАМН* 1996;13(2):52–9.
5. Хабиб О.Н., Белобородова Н.В., Осипов Г.А. Детектирование молекулярных маркеров бактерий в ткани клапанов сердца в норме и при патологии с применением метода газовой хроматографии и масс-спектрометрии. *Журн микробиол эпидемиол иммунол* 2004;(3):62–8.
6. Белобородова Н.В., Осипов Г.А. Гомеостаз малых молекул микробного происхождения и его роль во взаимоотношениях микроорганизмов с хозяином. *Вестн РАМН* 1999;16(7):25–31.
7. Beloborodova N.V., Osipov G.A. Small molecules originating from microbes (SMOM) and their role in microbes-host relationship. *Microb Ecol Heal Dis SCUP* 2000;12:12–21.
8. Осипов Г.А., Парфенов А.И., Верховцева Н.В. и др. Клиническое значение исследования микроорганизмов слизистой оболочки кишечника культурально-биохимическим и хромато-масс-спектрометрическим методами. *Эксп клин гастроэнтерол* 2003;4:59–67.
9. Acevedo H.F., Slifkin M., Pouchet-Melvin G.R. et al. Choriogonadotropin-like antigen in an anaerobic bacterium, eubacterium lentum, isolated from a rectal tumor. *Infect Immun* 1979;24(3):920–4.
10. Linder R. *Rhodococcus equi* and *Arcanobacterium haemolyticum*: Two «coryneform» bacteria increasingly recognized as agents of human infection. *Emerg Infect Dis* 1997;3(2):145–53.
11. Гельфанд Б.Р., Руднов В.А. Проценко Д.Н. и др. Сепсис: определение, диагностическая концепция, патогенез и интенсивная терапия. *Инфекц хир* 2004;2(2):2–16.
12. Bowler P.G., Duerden B.I., Armstrong D.G. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clin Microbiol Rev* 2001;14(2):244–69.
13. Брискин Б.С. Еще раз к вопросу о сепсисе. *Инфекц хир* 2004;2(4):33–6.
14. Ерюхин И.А., Шашков Б.В. Эндогенный токсикоз в хирургической клинике. СПб.: Логос, 1995.
15. 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;12(5):778–83.