

Возможности хромато-масс-спектрометрии для диагностики микробиологических нарушений в педиатрической практике.



Новикова В.П.
СПбГПМА
2012

- **Контроль микроэкологического статуса человека уже сейчас является проблемой практического здравоохранения.**
- **Применяемые на сегодняшний день в клинической практике методы диагностики инфекции имеют определенные ограничения и недостатки.**

Классическое бактериологическое исследование

- **Дороговизна**
- **Длительность (7-10 дней)**
- **Невозможность оценить роль некультивируемых микроорганизмов в инфекционно-воспалительном процессе, прежде всего – анаэробов.**

Иммуно-серологический метод

- Является непрямым - определяется не возбудитель, а иммунный ответ на него, который может иметь индивидуальные вариации.

Молекулярно-биологические методы (ПЦР, гибридизация РНК и ДНК)

преимущества

- **прямое определение возбудителя**
- **высокие специфичность и чувствительность**
- **универсальность**
- **скорость**
- **возможность диагностики хронических и латентных инфекций**

недостатки

- **частые ложно-положительные результаты**
- **невозможность адекватной количественной оценки.**

Persing, 1991; Fenollar, 2006; Михайлова, 2008 .

- **Контролировать состав пристеночной микробиоты кишечника и других органов оказалось возможным с помощью метода газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией по содержащимся в клеточной стенке длинноцепочечным жирным кислотам (ЖК) и жирным альдегидам фосфолипидов.**
- **Известно, что состав жирных кислот микроорганизмов видоспецифичен и используется для их идентификации в чистой культуре.**

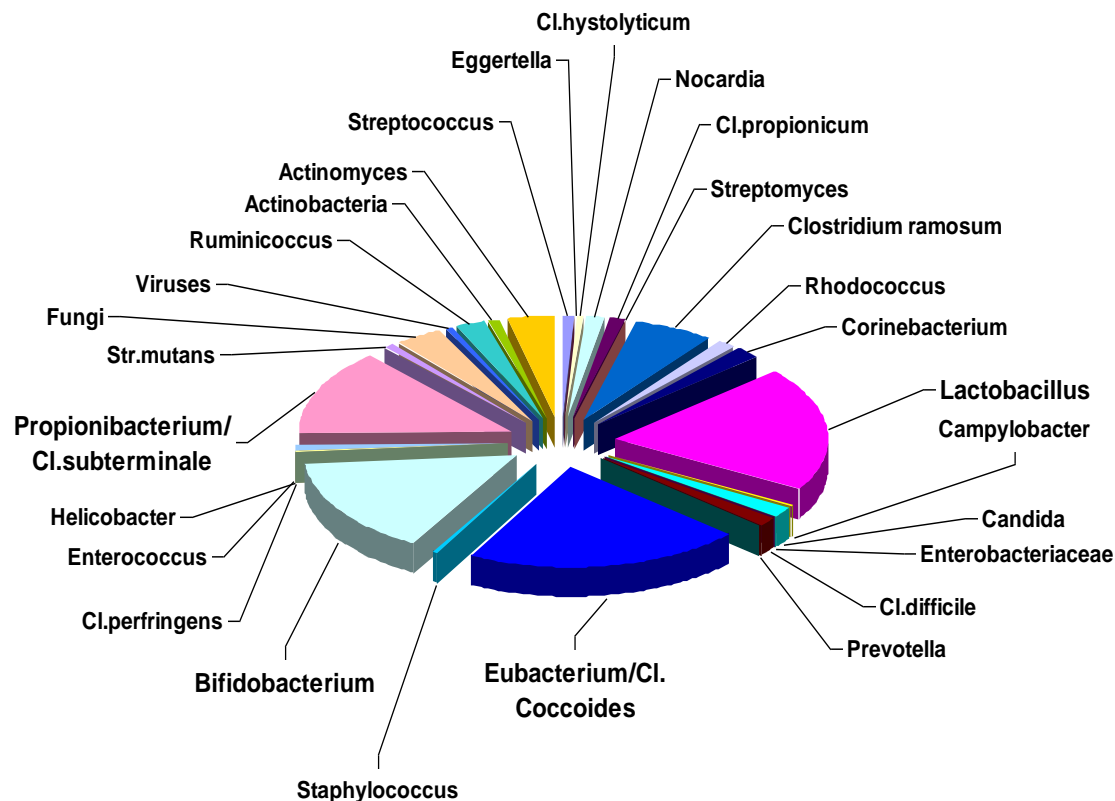
(Chemical methods.., 1995;
Stead, 1992).

- **Метод детектирования микроорганизмов по видоспецифичным высшим жирным кислотам клеточной стенки сходен с генетическим анализом, поскольку состав жирных кислот детерминирован в ДНК и воспроизводится путем репликации участка генома транспортными РНК и последующего синтеза ЖК в митохондриях по матричным РНК.**

- **Существо анализа состоит в прямом извлечении с помощью химической процедуры высших жирных кислот из образца, подлежащего исследованию (например, биоптата кишечной стенки или крови), их разделения на хроматографе в капиллярной колонке высокого разрешения и анализа состава в динамическом режиме на масс-спектрометре.**
- **На основании этих измерений расшифрован состав микробиоты пристеночного мукозного слоя этих отделов кишечника, а также фекалий**

(Осипов, 2003).

Концентрация микроорганизмов пристеночного слоя кишечника в биоптатах кишечной стенки здоровых людей



- Концентрация микробных маркеров в биоптатах кишечной стенки здоровых людей по порядку величины оказалась одинаковой для тощей, подвздошной и толстой кишок ($0,6 - 1) \times 10^{11}$ кл/г, но существенно меньшей по сравнению с фекалиями ($2,7 \times 10^{11}$ кл/г).

- Основную долю (от 70% в тощей кишке до 88% в фекалиях) микроорганизмов во всех отделах кишечника составляют анаэробы.
- Второе место по численности в тощей кишке занимают актинобактерии (кроме бифидо- и пропионобактерий) – 17% (в фекалиях их всего 0,7 %).
- Аэробные кокки (стафилококки, стрептококки, энтерококки и коринеформные бактерии) – составляют 5% колонизации тонкой кишки по сравнению с 0,7 % в фекалиях.
- Доля энтеробактерий и энтерококков по отделам кишечника и в фекалиях близка к 2%.
- Кишечная микробиота представляет собой доминирующий континуум штаммов и видов родов *Clostridium* и *Eubacterium* в их современном написании при равновеликом суммарном количестве бифидобактерий, пропионобактерий и лактобацилл.
- На долю остального биоразнообразия микроорганизмов кишечника (по данным масс-спектрометрии) приходится до 10% в фекалиях и пристеночном слое ободочной кишки и до 30% в тощей кишке.

(Osipov, 2009).

- **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.**

- **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.**
- **Обеспечивает возможность при проведении анализа одного образца одновременного детектирования десятков маркеров микроорганизмов и 122 вещества из состава ЖК, стерина и спиртов.**

- 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 Monitoring).
- Масс-спектрометр квадрупольный с диапазоном масс 2-1000 аем, имеет разрешающую способность 0,5 аем во всем рабочем диапазоне. Чувствительность прибора 50 пг по метил-стеарату в режиме непрерывного сканирования и 1 пг. в режиме селективных ионов.
- Для анализа используют кварцевую капиллярную колонку с неподвижной фазой HP-5 ms.
- Для обсчета данных на персональном компьютере разработан алгоритм который можно использовать на PC с операционной системой Windows 2000 или XP, NT.

Патенты



- 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.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

Литература

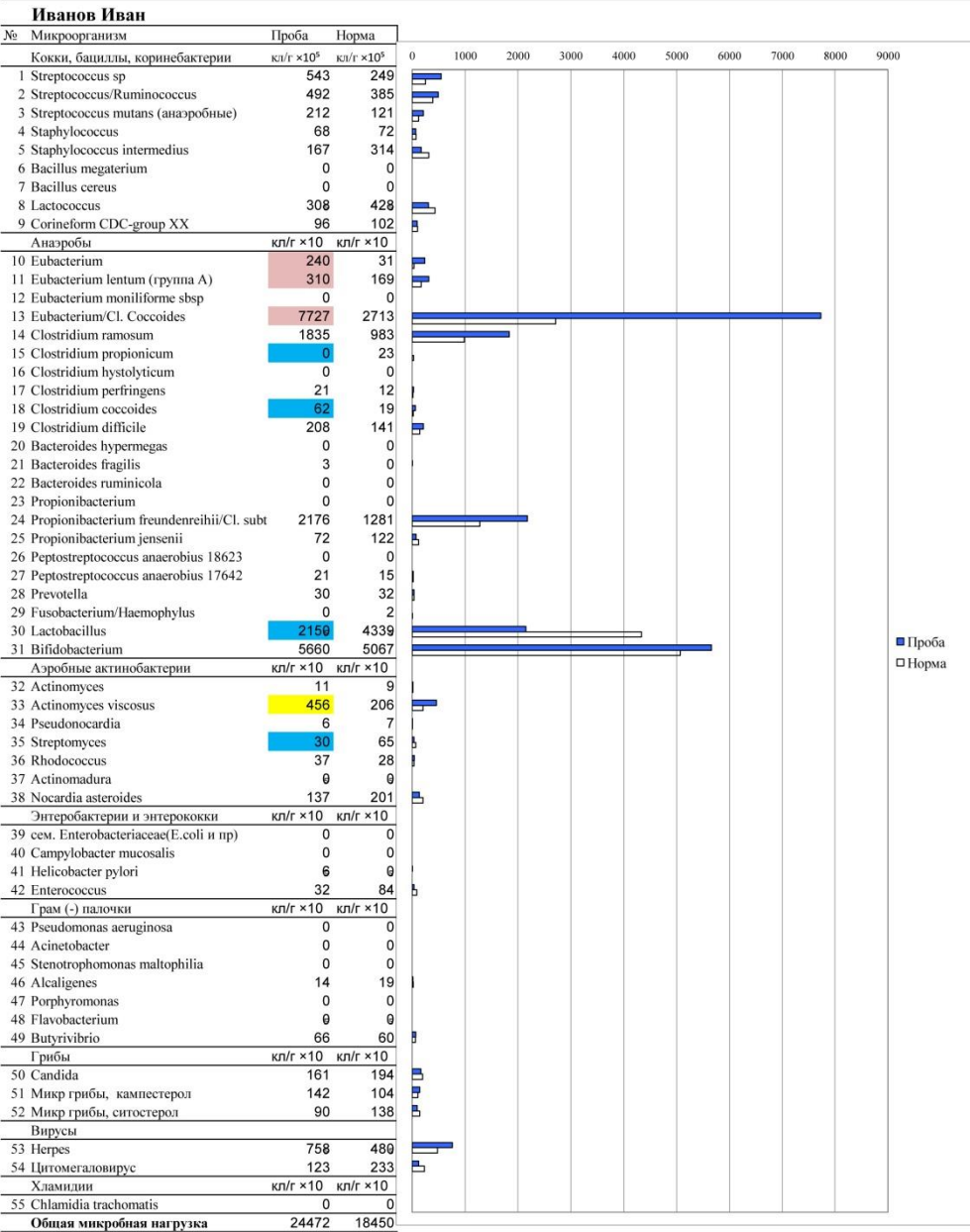
- **Роль анаэробов в возникновении урогенитальных инфекций. Пособие для врачей. Утверждено секцией №14 Ученого Совета МЗ РФ по проблеме "Кожные болезни, заболевания, передаваемые половым путем" Протокол №3 от 9 сентября 1997 г. ЦНИКВИ, 1998, 16 с.**
- **Бондаренко В.М., Грачева Н.М., Мацулевич Т.В. «Дисбактериозы 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.**

Нозологическая специфичность изменений состава кишечной микробиоты

- **Метод масс-спектрометрии микробных маркеров, благодаря своей экспрессности и информативности, позволил получить экспериментальные данные, подтверждающие связь ряда заболеваний с изменением микроэкологического статуса организма.**
- **Например, при синдроме раздраженного кишечника наблюдается тотальный дефицит кишечной микробиоты до семикратного снижения общей численности микроорганизмов при избыточном росте эубактерий и стрептококков.**



микробной хроматографии



Выполнено 16.05.2012. Общая микробная нагрузка повышена.

Превышение более чем в три раза -

Превышение более чем в два раза -

Дефицит более чем в два раза -

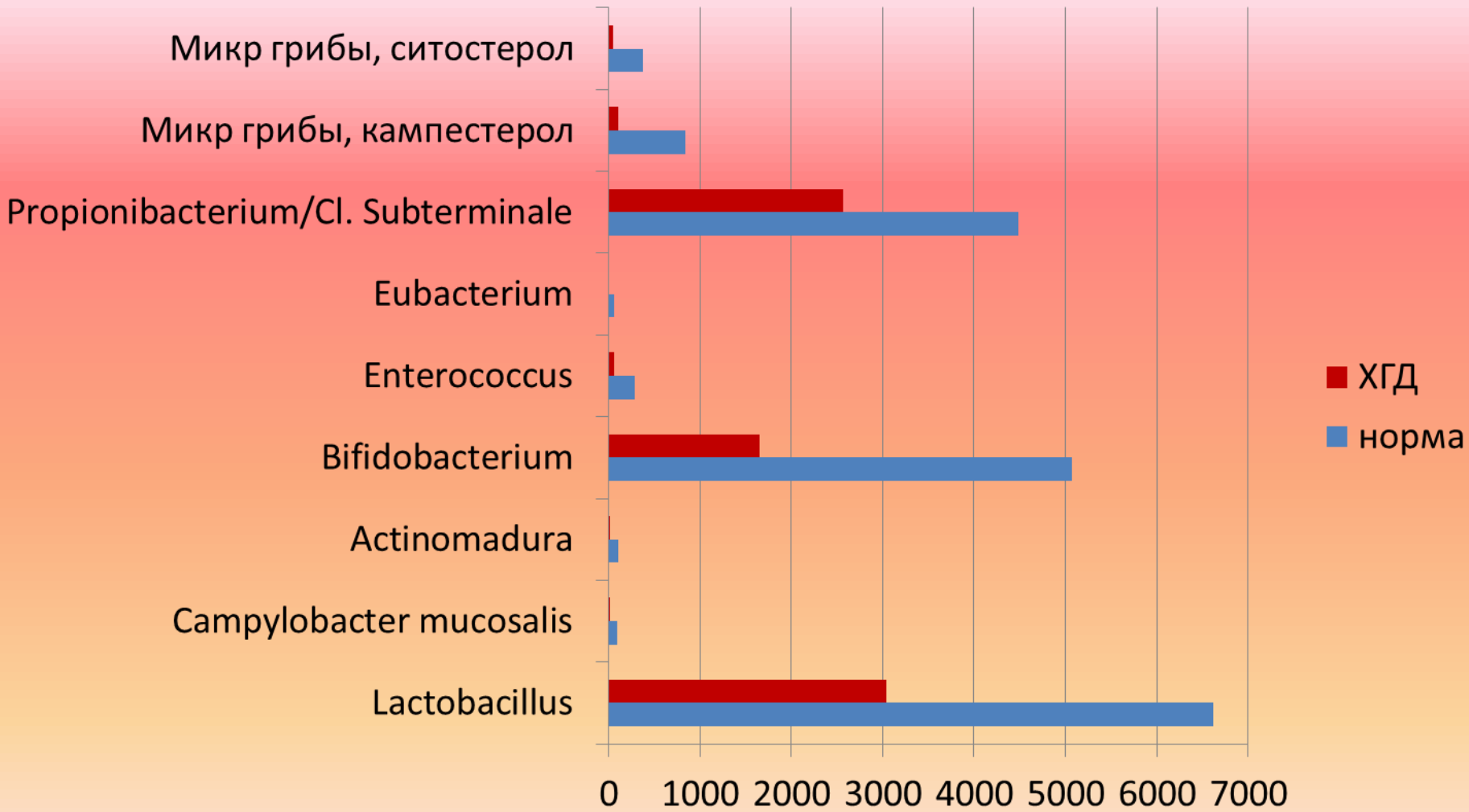
Прием биоматериалов:

- СПб -медицинские офисы «Витамед» ул. Ак. Лебедева д.10 лит А
- А так же в Петрозаводске и Калининграде

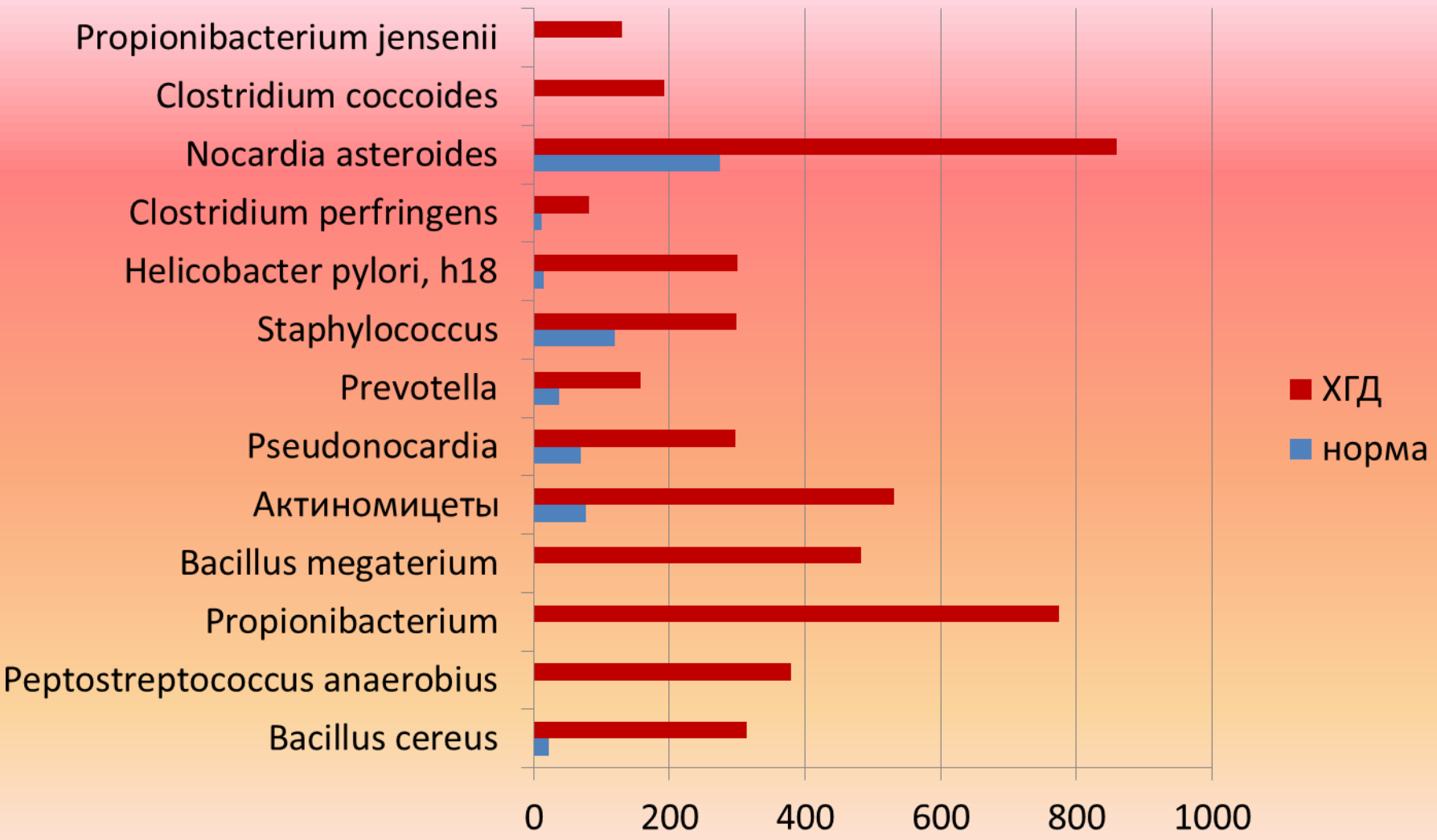
Все адреса представлены на сайте: dysbio.ru

Разработан автоматический алгоритм анализа с помощью штатных программ ГХ-МС, позволяющих определить концентрацию более 50 микроорганизмов в материале через три часа после его поступления в лабораторию.

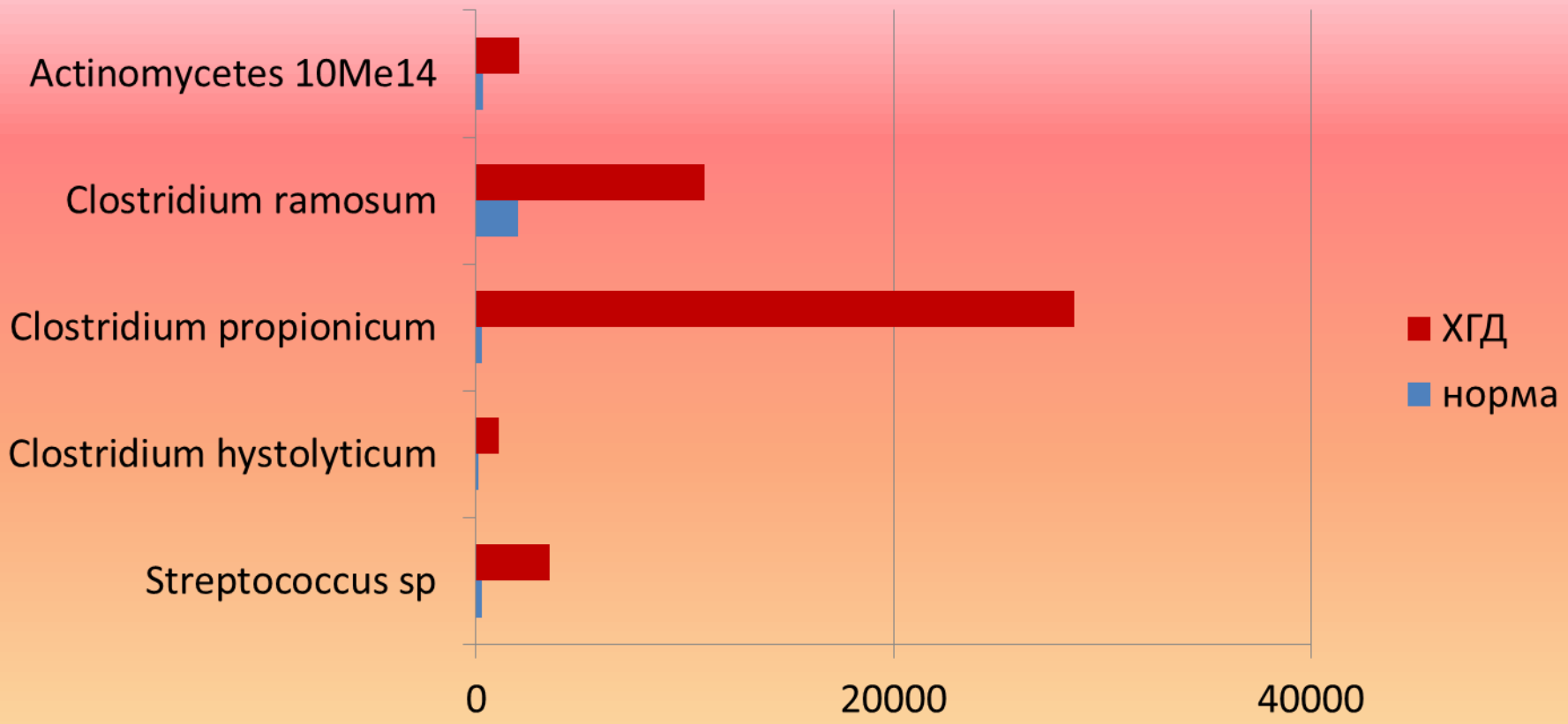
- Снижение титра некоторых бактерий в пристеночной микрофлоре тонкой кишки у детей при ХГД по результатам масс-спектрометрии (кл/гх10⁵).



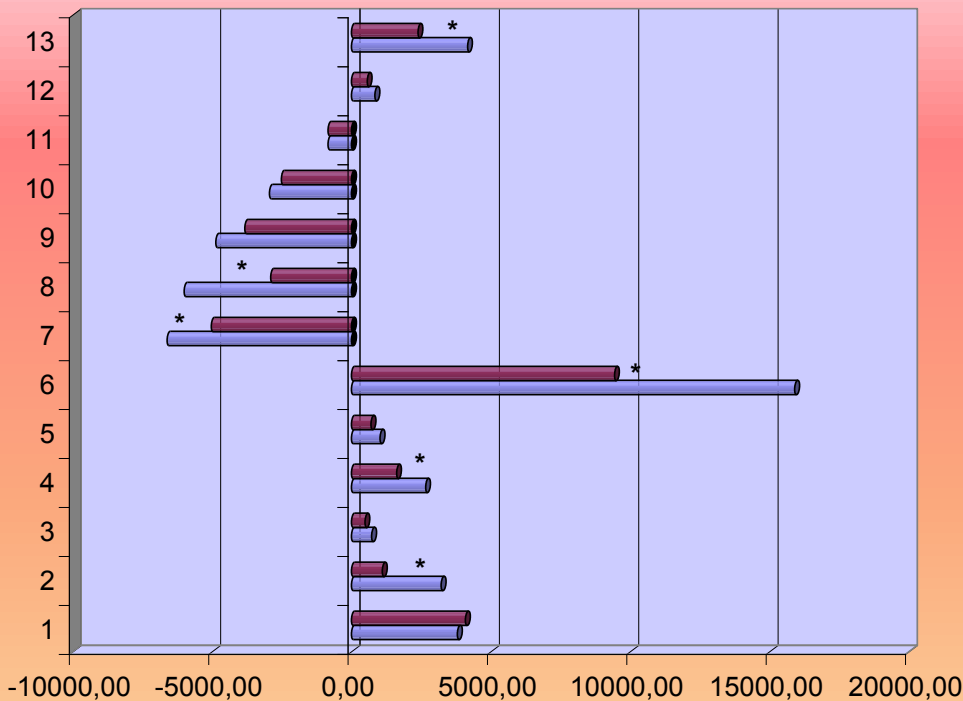
- Повышение титра некоторых бактерий в пристеночной микрофлоре тонкой кишки у детей при ХГД по результатам масс-спектрометрии (кл/гх10⁵)



- Повышение титра некоторых бактерий в пристеночной микрофлоре тонкой кишки у детей при ХГД по результатам масс-спектрометрии (кл/гх10⁵)



Состояние пристеночной микрофлоры в периоде обострения и ремиссии



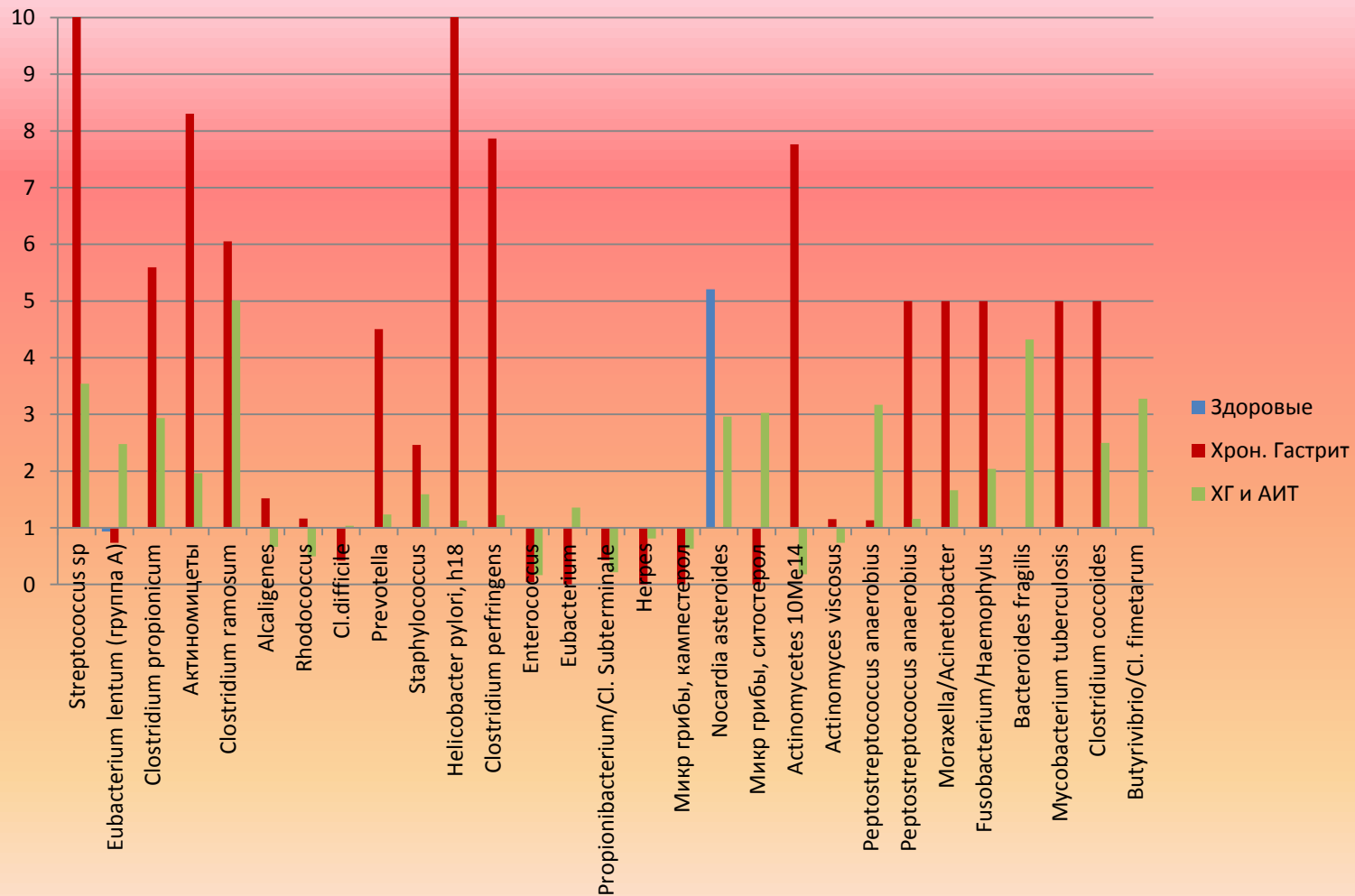
* - $p < 0,01$

По оси X – показано содержание
микроорганизмов в Кл/г x 10⁵

Новикова В.П., Гурова М.М. 2011

- 1 – *Streptococcus*,
- 2 – *Clostridium hystolyticum*,
- 3 – *Peptostreptococcus anaerobius*,
- 4 – *Clostridium propionicum*,
- 5 – Актиномицеты,
- 6 – *Clostridium ramosum*,
- 7 – *Lactobacillus*,
- 8 – *E.moniliforme*,
E.nodatum, *E.sabureum*,
- 9 – *Bifidobacterium*,
- 10 – *Propionibacterium*,
- 11 – Микр. грибы,
кампестерол,
- 12 – *Nocardia asteroides*,
- 13 – *Actinomycetes 10Me14*.

Особенности пристеночной микрофлоры тонкой кишки у детей при ХГД и сопутствующем АИТ по результатам масс-спектрометрии (кл/гх10⁵).



Избыточный рост кишечной микробиоты при ХГ и АИТ (кл/гх 10⁵)

Группа	Здоровые	ХГ	ХГ+АИТ
	n=20	n=20	n=20
Eubacterium lentum	63,4±20,5*	50,0±25,6*	168,6±37,2
Peptostreptococcus anaerobius	1330,7±241,9	44,8±44,8**	722,4±139,8
Cl.difficile	374,2±35,8	161,5±20,0**	398,2±69,5
Bacteroides fragilis	6,5±4,9	0,0±0,0**	5,4±1,9
Enterococcus	42,3±15,0	13,0±9,4**	47,1±12,5
Eubacterium	105,66±46,07	0,0±0,0**	80,0±18,66
Herpes	67,1±14,0	0,0±0,0**	47,9±18,7
Микр грибы, кампестерол	530,3±74,3	0,0±0,0**	529,4±89,4
Микр грибы, ситостерол	1097,5±111,3	0,0±0,0**	1162,3±221,3
Butyrvibrio/Cl. Fimetarum	47,3±19,7	0,0±0,0*	26,9±12,2

* — p < 0,05 ** — p < 0,01

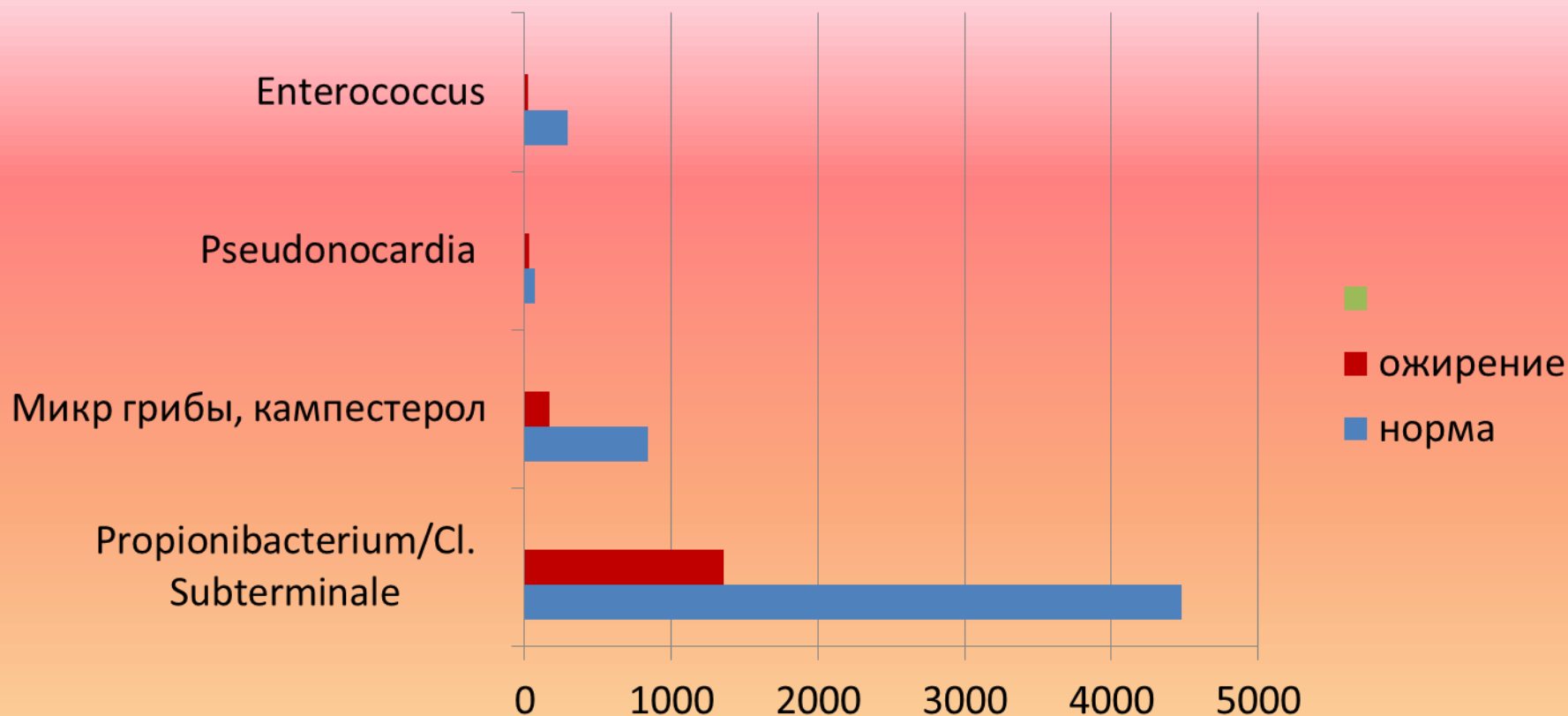
Дефицит кишечной микробиоты при ХГ и АИТ (кл/гх 10⁵)

Группа	Здоровые	ХГ	ХГ+АИТ
	n=20	n=20	n=20
Streptococcus sp	1195,3±272,2	3969±570**	881,3±120,6
Peptostreptococcus anaerobius	72,0±38,1	492,0±64,9**	19,4±19,4
Moraxella/Acinetobacter	1,2±1,2	19,3±3,8*	3,2±2,4
Актиномицеты	263,4±61,0	639,3±66,8**	151,1±19,3
Fusobacterium/Haemophilus	0,3±0,3	22,3±1,1*	5,8±5,4
Alcaligenes	29,0±5,3	73,0±8,2*	31,8±7,5
Rhodococcus	205,6±28,1	491,2±44,3**	208,8±28,8
Prevotella	54,7±20,1	171,2±10,9**	46,9±8,6
Staphylococcus	172,9±17,8	295,4±18,0*	191,0±36,2
Helicobacter pylori, h18	19,7±10,5	338,5±16,7**	15,8±4,1
Propionibacterium/Cl. Subt.	706,2±73,0	1915±252**	964,1±176,2
Mycobacterium tuberculosis	0,0±0,0	200,7±47,3**	0,0±0,0
Actinomycetes 10Me14	1,0±1,0	2398±198**	55,4±53,0
Clostridium coccoides	94,0±13,9	215,3±14,4**	80,7±9,1
Actinomyces viscosus	1137,8±134,3	1371,6±276,4*	873,6±132,2
Nocardia asteroides	1426,9±174,5*	813,2±140,5	810,8±154,5
Clostridium perfringens	17,1±1,9*	94,4±7,2*	14,66±3,15

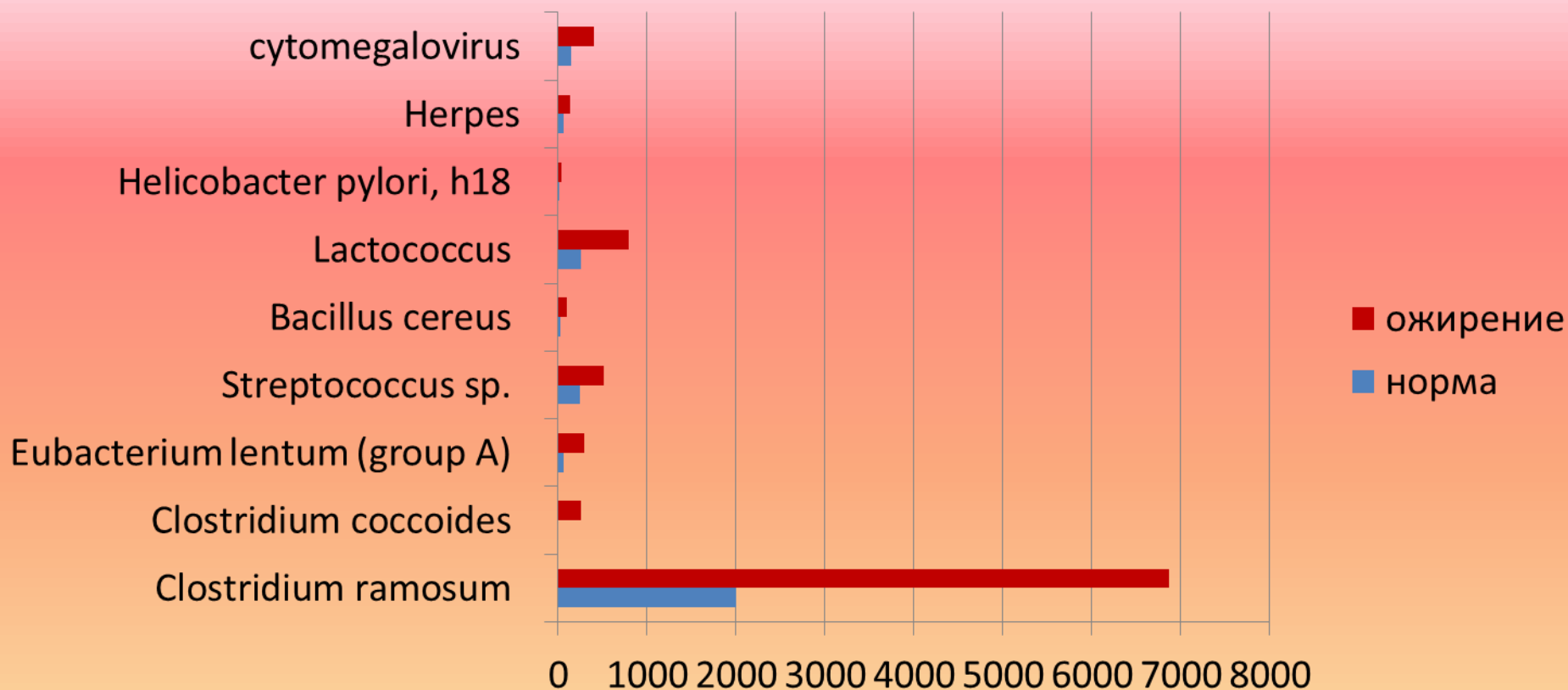
* — p < 0,05 ** — p < 0,01

- Единственным возбудителем, который достоверно больше встречался в группе пациентов с ХГ и АИТ как по сравнению с группой пациентов с ХГ, так и по сравнению с группой здоровых детей- *Eubacterium lentum* ($p < 0,05$).
- Выявлена корреляционная взаимосвязь между концентрацией *Eubacterium lentum* и уровнем гормонов щитовидной железы : Т4- $r = -0,683$, $p < 0,05$, ТТГ- $r = 0,734$, $p < 0,05$ и объемом щитовидной железы по результатам УЗИ- $r = -0,658$, $p < 0,05$.
- Отмечается корреляционная взаимосвязь между концентрацией *Eubacterium lentum* и степенью фиброза антрального отдела желудка $-r = -0,52$, $p < 0,05$ при гистологическом исследовании биоптатов.

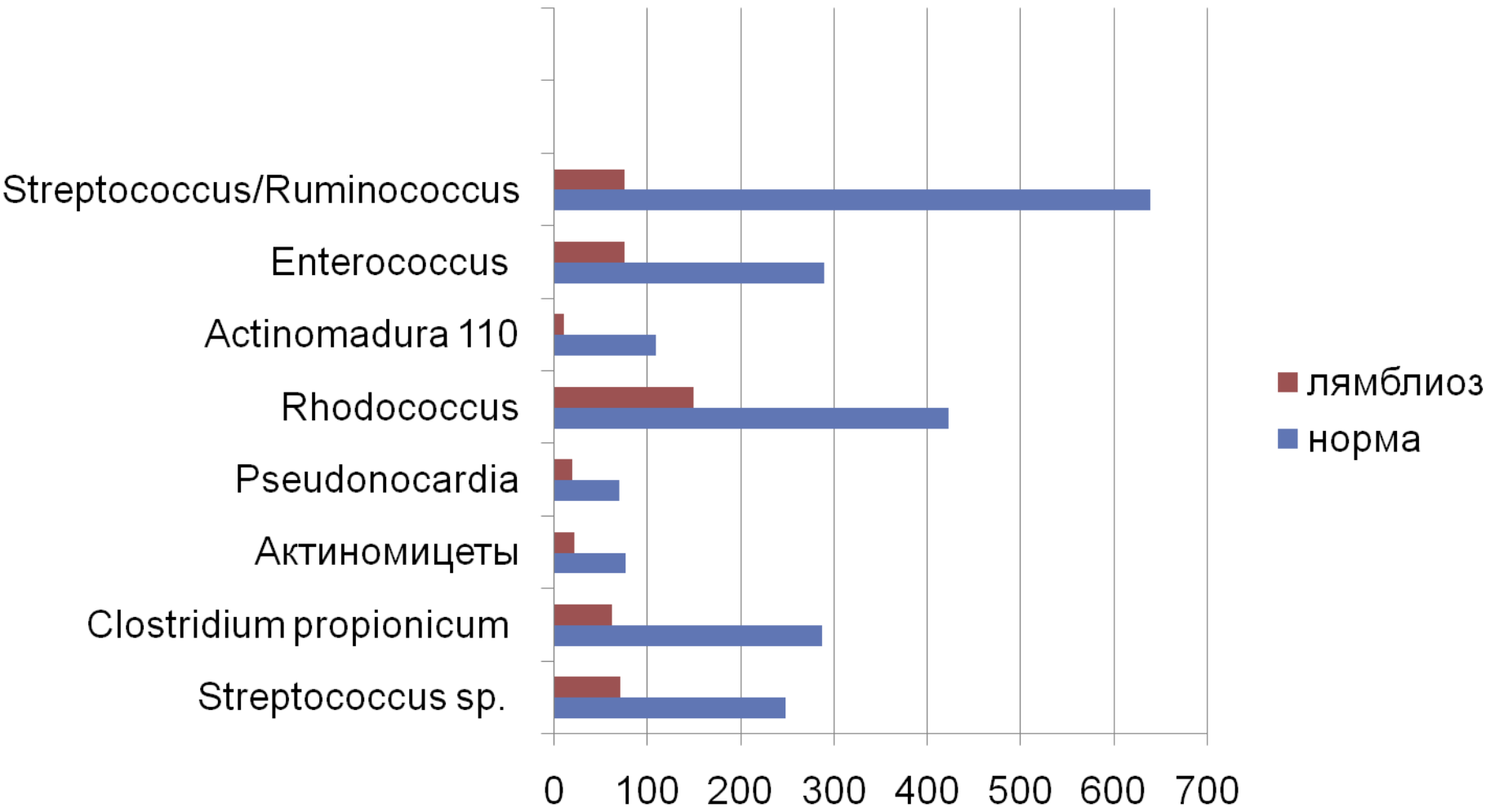
Снижение титра представителей нормальной пристеночной микрофлоры тонкой кишки у детей при ожирении по результатам масс-спектрометрии (кл/гх10⁵).



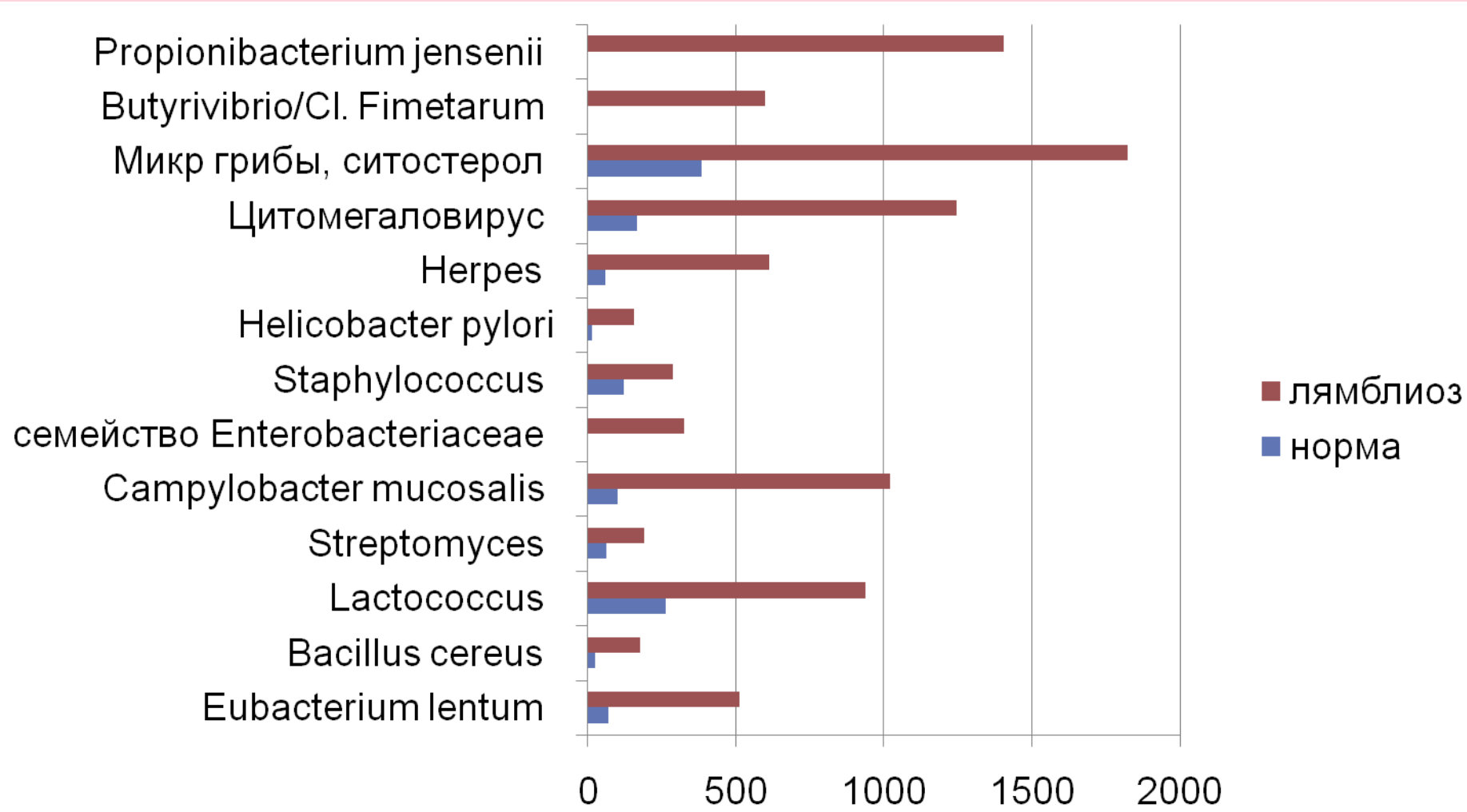
Повышение титра некоторых бактерий в пристеночной микрофлоре тонкой кишки у детей при ожирении по результатам масс-спектрометрии (кл/гх10⁵)



- Снижение титра представителей нормальной пристеночной микрофлоры тонкой кишки у детей при лямблиозе по результатам масс-спектрометрии (кл/гх10⁵)



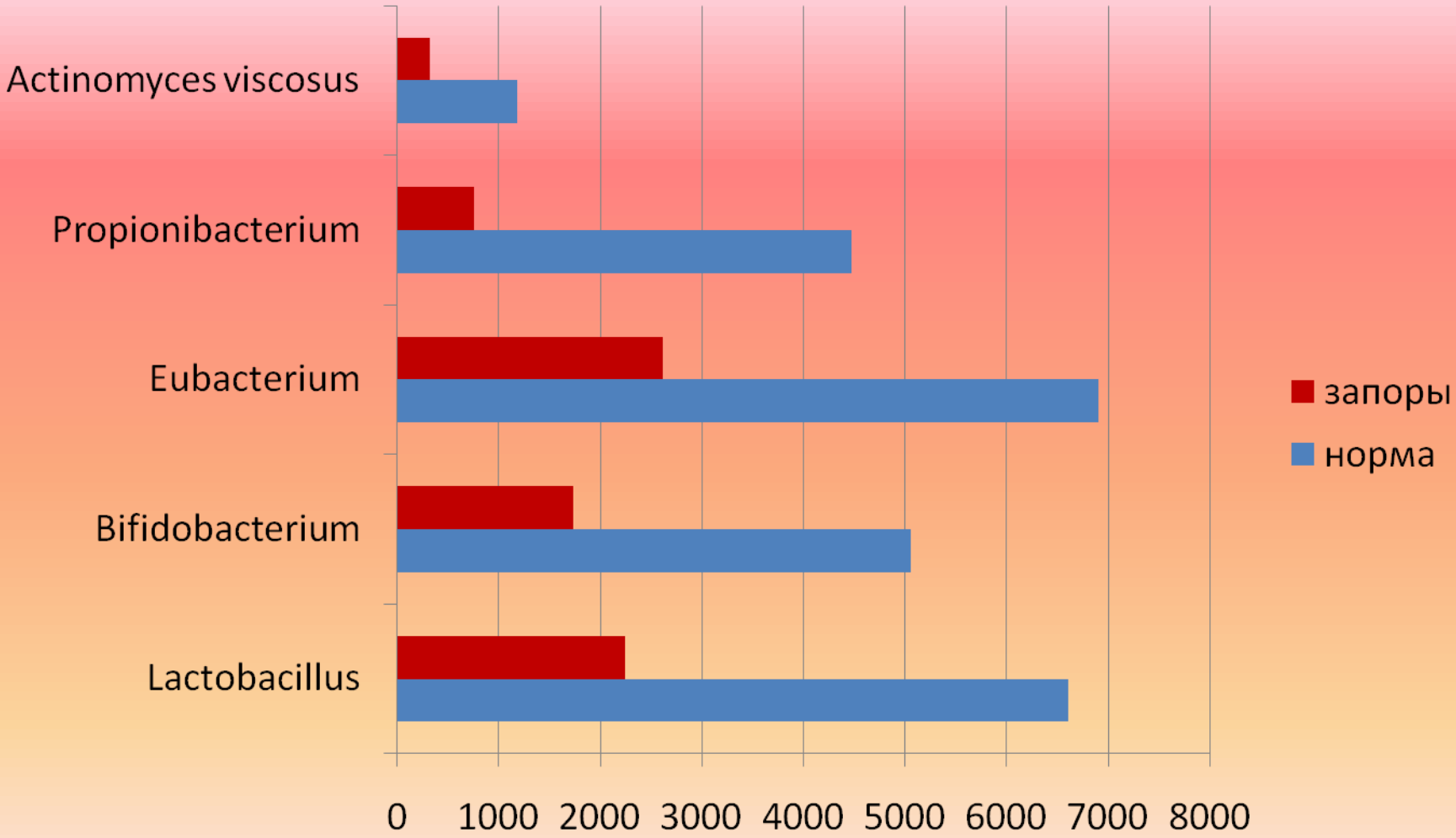
- Повышение титра некоторых бактерий в пристеночной микрофлоре тонкой кишки у детей при лямблиозе по результатам масс-спектрометрии (кл/гх10⁵)



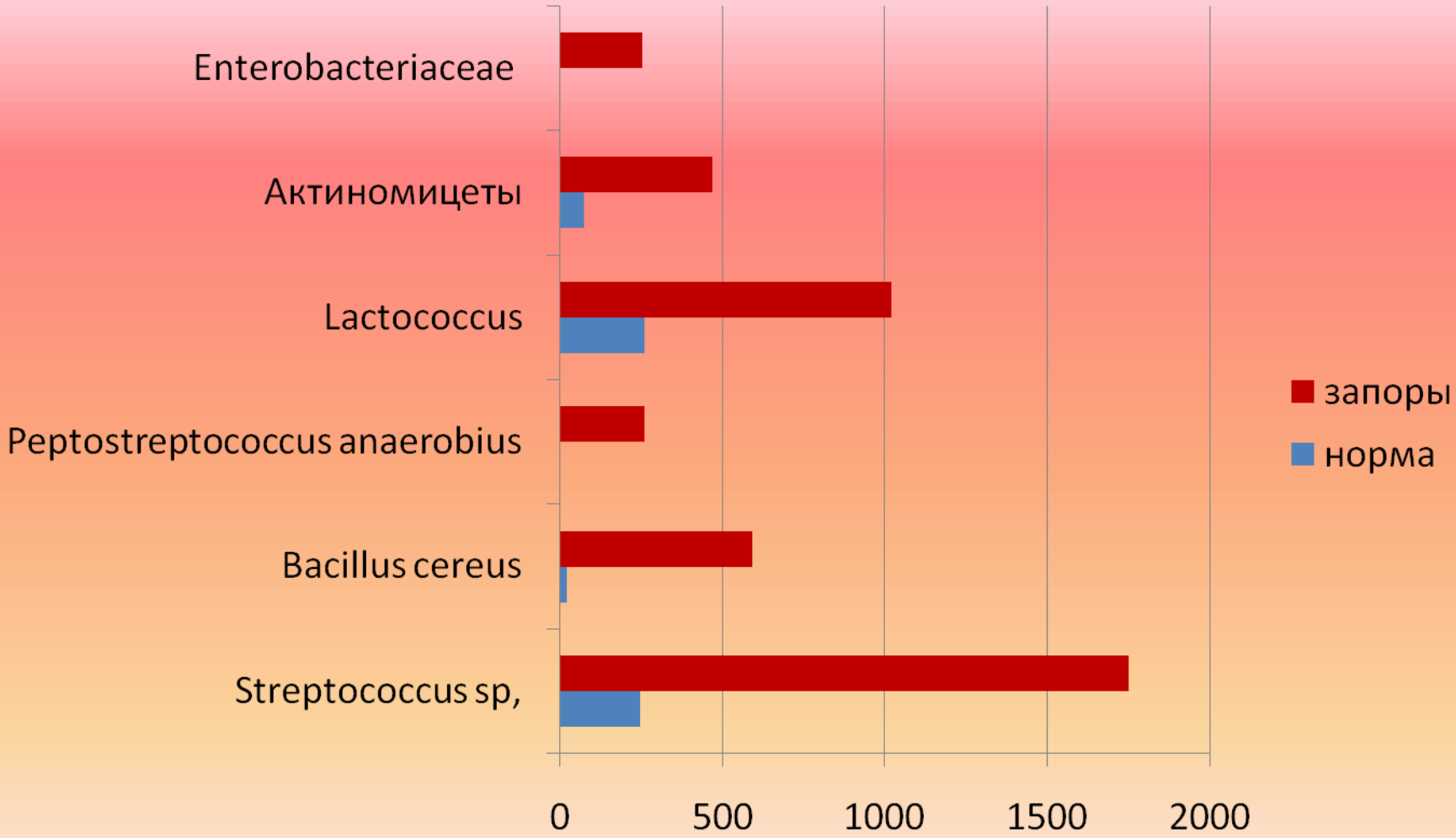
Новикова В.П., Гурьева В.А. и др. 2011

Clostridium ramosum (2000 кл/гх10⁵ и 7083±343 кл/гх10⁵)

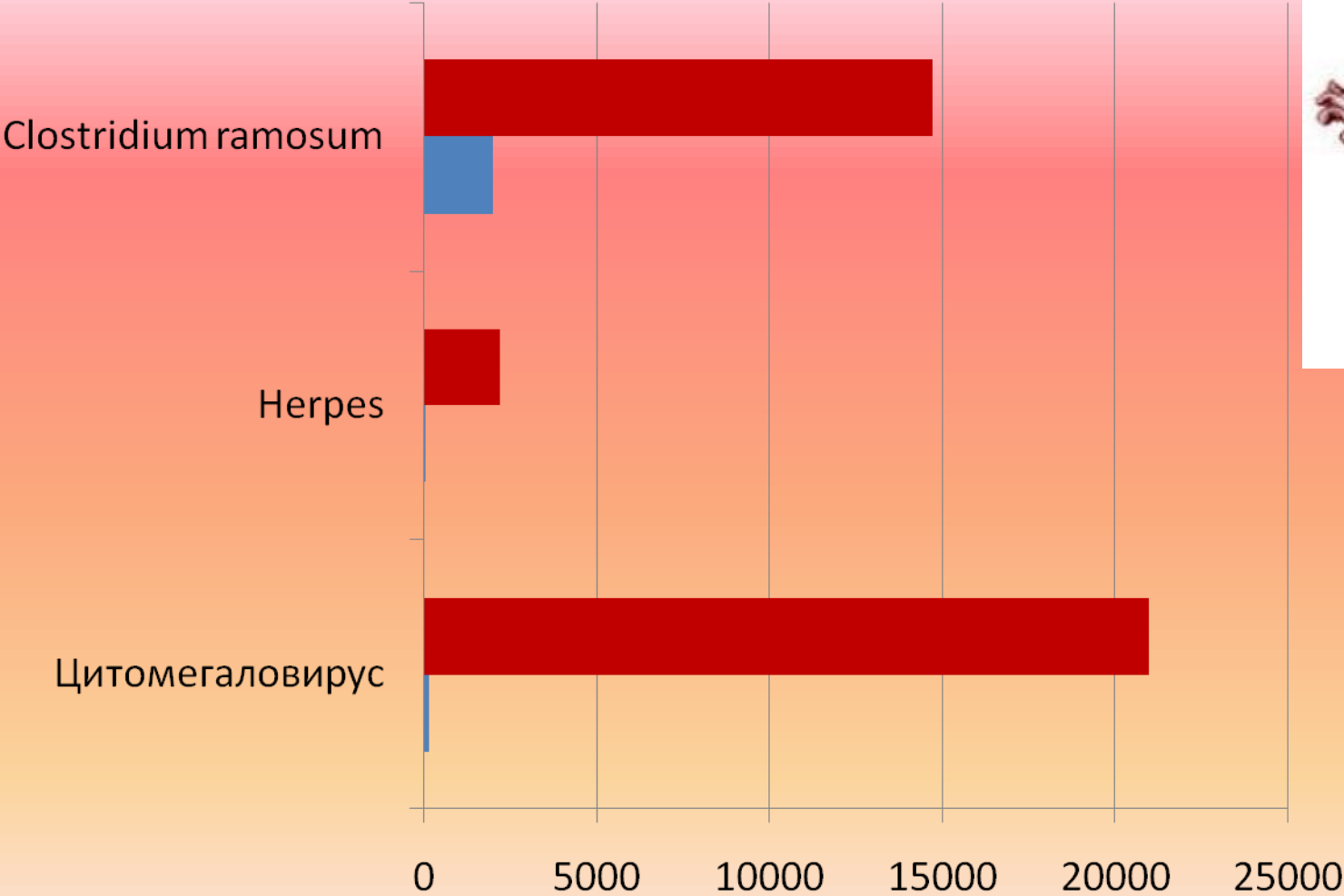
- Снижение титра представителей нормальной пристеночной микрофлоры тонкой кишки у детей раннего возраста при запорах



- Повышение титра некоторых бактерий в пристеночной микрофлоре тонкой кишки у детей раннего возраста при запорах

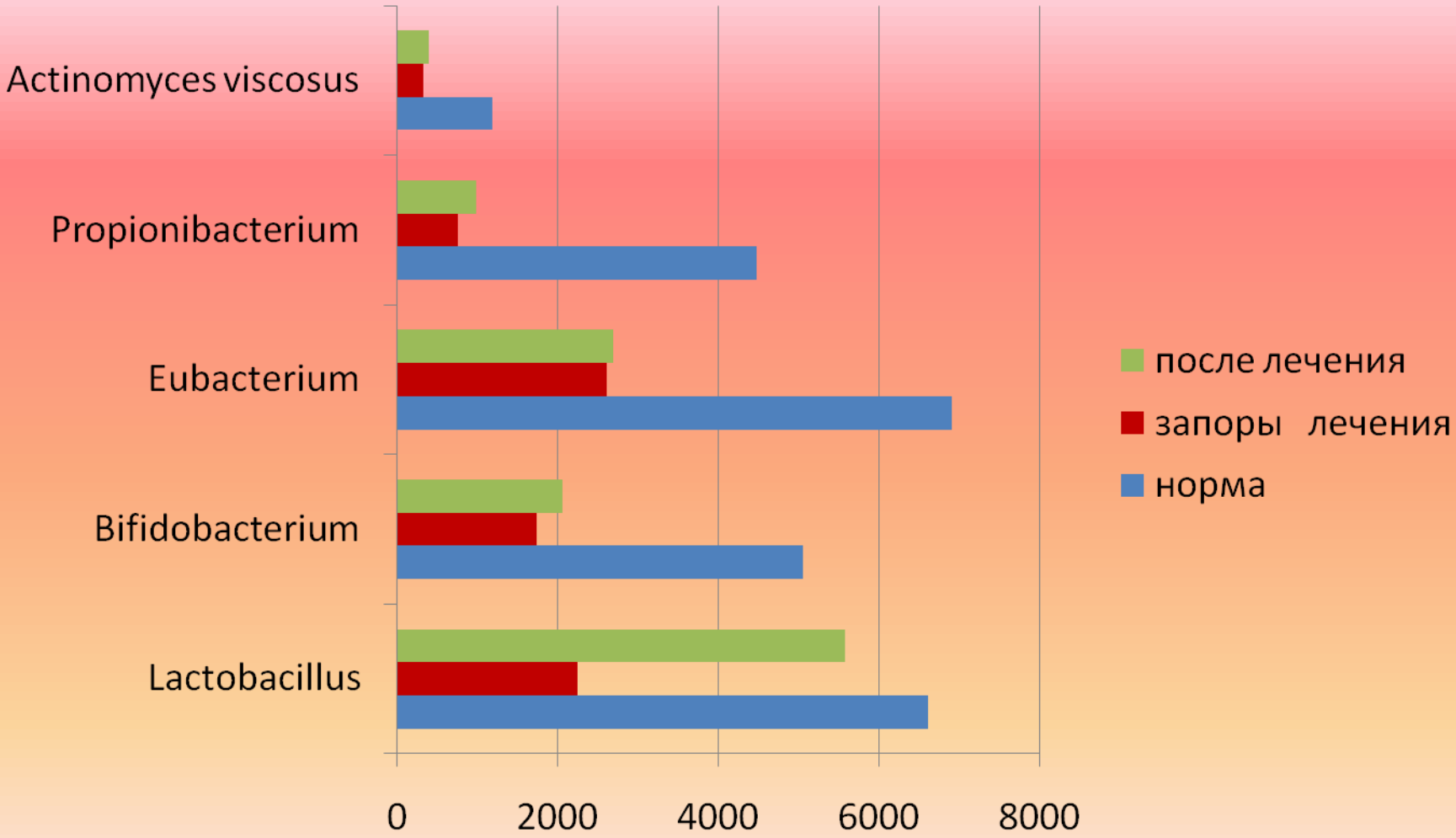


- Повышение титра некоторых бактерий и вирусов в пристеночной микрофлоре тонкой кишки у детей раннего возраста при запорах

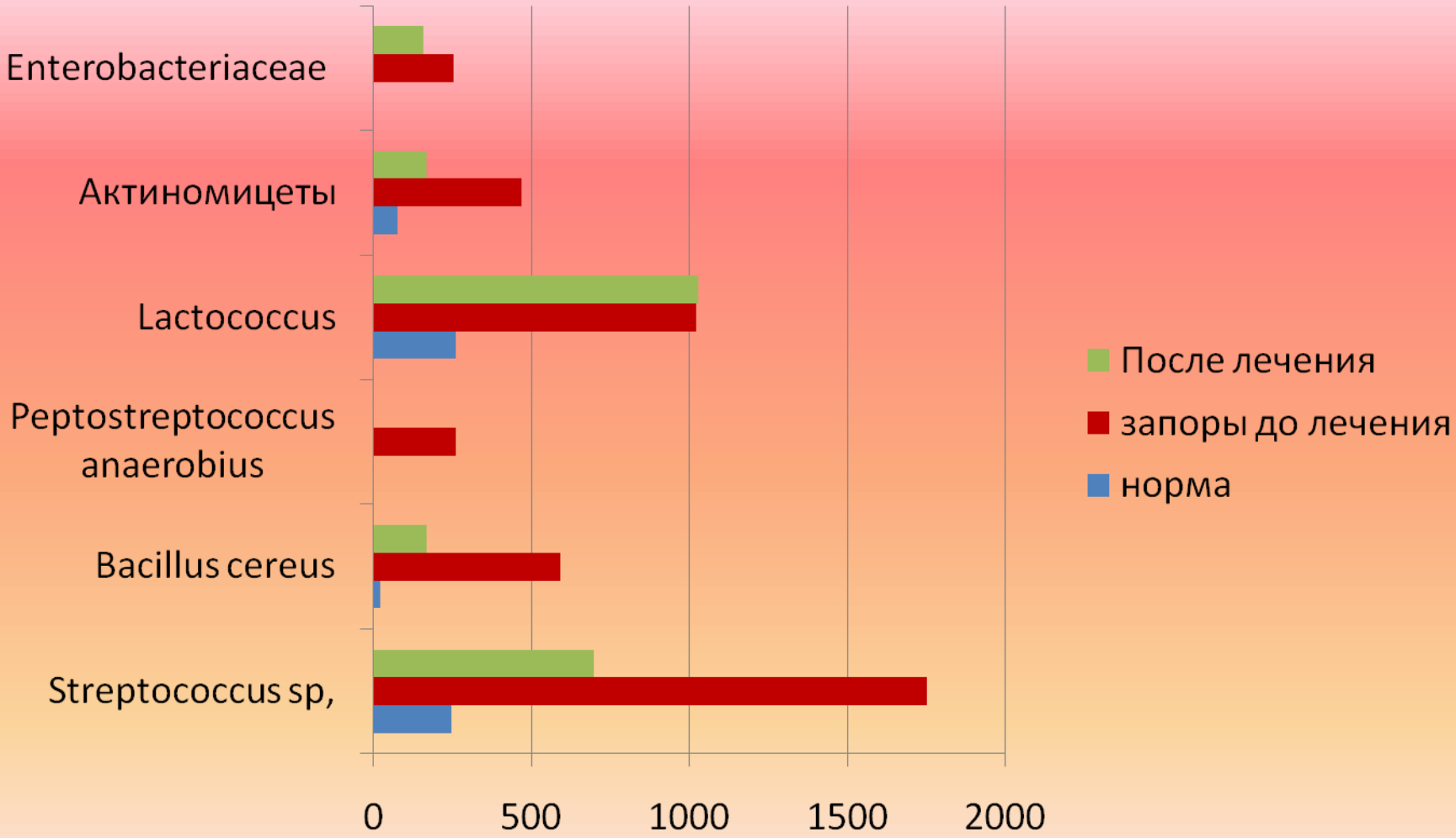


■ запоры
■ норма

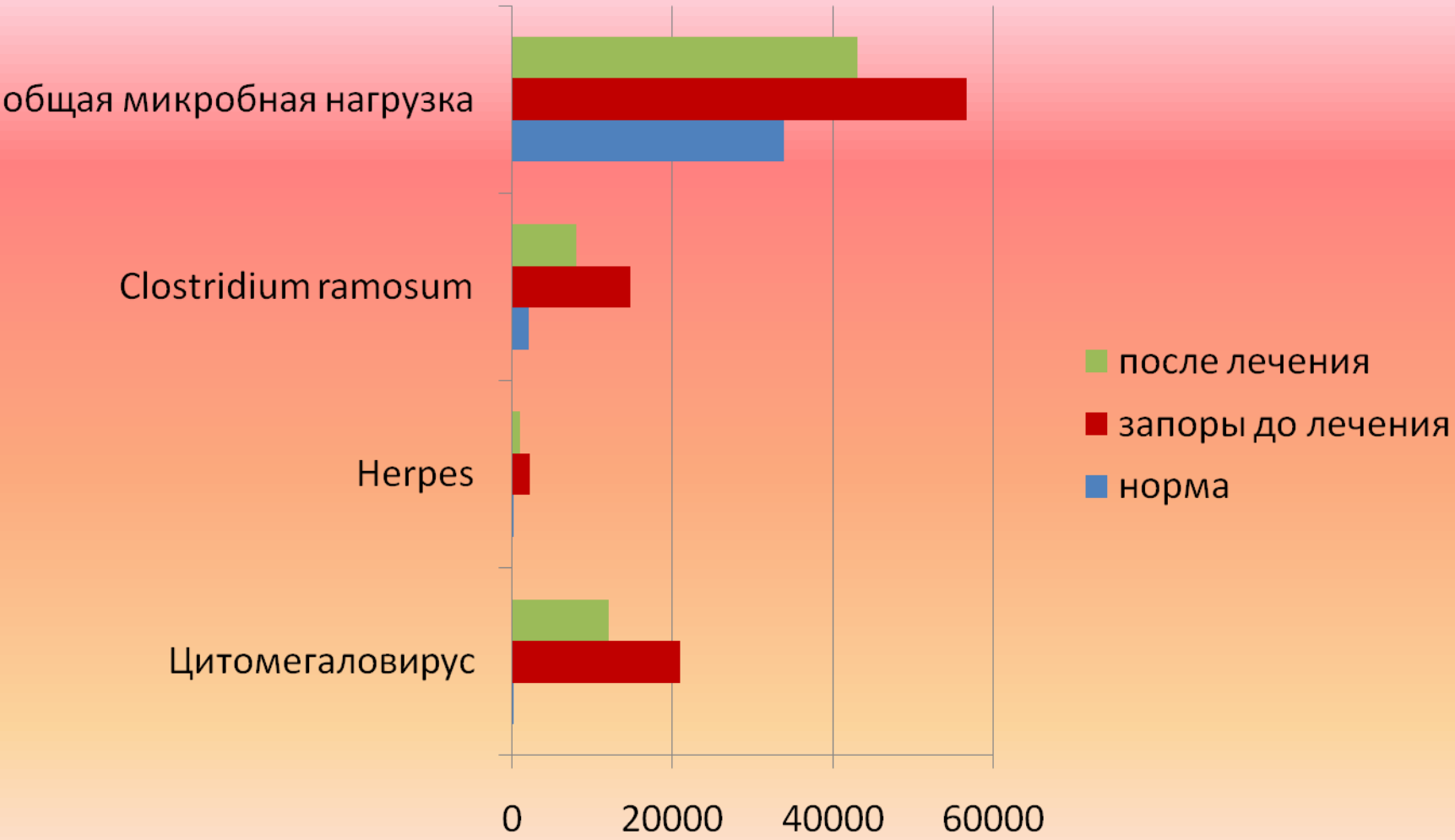
- Динамика титра представителей нормальной пристеночной микрофлоры тонкой кишки у детей раннего возраста при запорах после лечения Экспорталом



- Динамика титра некоторых бактерий в пристеночной микрофлоре тонкой кишки у детей раннего возраста при запорах после лечения Экспорталом**



- **Динамика титра некоторых бактерий и вирусов в пристеночной микрофлоре тонкой кишки у детей раннего возраста при запорах после лечения Экспорталом**



Взаимосвязь отдельных представителей микрофлоры кишечника и клинических симптомов

Симптомы, с которыми выявлена положительная корреляция	Представитель биоценоза
Боли в животе около пупка Отрыжка воздухом Рвота Необходимость дополнительных усилий при дефекации	Cl.propionicum
Боли по всему животу Тошнота по утрам Метеоризм Бледность кожных покровов Неустойчивый стул Жирный стул Появление слизи в стуле Непереваренный стул Энтеритный копрологический синдром Беспокойный сон и ранние пробуждения	Cl.ramosum
Пузырные симптомы Уровень ДАД	Пептострептококки

Заключение:

- **1. 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.
- **С помощью метода выявлена нозологическая специфичность микробиоценоза кишечника при ХГД, ХГД и АИТ, ожирении, лямблиозе и запорах у детей.**

Благодарю за внимание

