

МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ

УДК 616.37-002.4 – 022-084

Г.Ц. Дамбаев¹, В.П. Саганов¹, Л.Д. Раднаева^{1, 2}, В.Е. Хитрихеев¹, Е.Н. Цыбиков¹**МИКРОБНЫЙ ПЕЙЗАЖ ОПЕРИРОВАННЫХ БОЛЬНЫХ С ОГРАНИЧЕННЫМ СТЕРИЛЬНЫМ ПАНКРЕОНЕКРОЗОМ В РАЗЛИЧНЫЕ ПЕРИОДЫ КОМПЛЕКСНОГО ЛЕЧЕНИЯ**¹ ФГБОУ ВПО «Бурятский государственный университет», Улан-Удэ, Россия
² ФГБУН «Байкальский институт природопользования» СО РАН, Улан-Удэ, Россия

Для изучения микробного пейзажа больных с панкреонекрозом предложен метод газовой хроматографии масс-спектрометрии. Обследовано 14 больных с ограниченным стерильным панкреонекрозом, которым выполнены операции, и в сравнительном контексте обследованы 18 здоровых людей. У больных с панкреонекрозом определяли концентрацию микроорганизмов в сыворотке крови при поступлении, в середине лечения и при выписке.

Ключевые слова: стерильный панкреонекроз, газовая хроматография – масс-спектрометрии

MICROBIAL LANDSCAPE OF OPERATED PATIENTS WITH LIMITED STERILE PANCREATIC NECROSIS IN DIFFERENT PERIODS OF COMPLEX TREATMENTG.Ts. Dambaev¹, V.P. Saganov¹, L.D. Radnaeva^{1, 2}, V.Ye. Khitrikheev¹, E.N. Tsybikov¹¹ Buryat State University, Ulan-Ude, Russia² Baikal Institute of Nature Management SB, RAS, Ulan-Ude, Russia

The method of gas chromatography – mass spectrometry was studied for the first time in patients with sterile pancreatic necrosis. The parameters defined in the normal conditions are presented. We studied the microbial landscape of patients with sterile pancreatic necrosis in the dynamics of complex treatment. Qualitative analysis was based on the comparison of retention times and mass specter of the total corresponding pure compounds using a library of standard data and mixtures NIST08.L. We detected elevated markers in patients with acute pancreatitis associated with anaerobic microflora (peptostreptococcus, staphylococci, eubacteria, fusobacterium, clostridium), and at the same time low level of lactobacilli, bifidobacteria, some ruminococcus, actinomycetes and other microorganisms that caused dysbiosis.

Key words: sterile pancreatic necrosis, gas chromatography – mass-spectrometry

ВВЕДЕНИЕ

Существующие на сегодняшний день стандартные методы диагностики панкреатогенной инфекции запаздывают в реальном режиме требования, когда жизненно важным становится вопрос о хирургическом лечении больных с панкреонекрозом [5]. Общеизвестно, что показанием к лапаротомной операции является наличие инфекции в поджелудочной железе и брюшинном пространстве [1]. Также необходимы лабораторные критерии, позволяющие ежедневно корректировать эффективность комплексного лечения больных с панкреатогенной деструкцией [2, 6, 8]. Все вышперечисленное послужило побудительной причиной для исследования.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Определить эффективность метода газовой хроматографии масс-спектрометрии в динамике комплексного лечения больных с ограниченным стерильным панкреонекрозом.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Метиловые эфиры жирных кислот и триметилсилильные эфиры исследовались методом ГХ-МС

на газовом хроматографе Agilent Packard HP 6890 с квадрупольным масс-спектрометром HP MSD 5973N в качестве детектора [4]. Для хроматографирования использовали колонку HP-5MS с внутренним диаметром 0,25 мкм. Процентный состав смеси вычислялся по площади газо-хроматографических пиков [3]. Качественный анализ основан на сравнении времен удерживания и полных масс-спектров соответствующих чистых соединений с использованием библиотеки данных NIST08.L и стандартных смесей (Bacterial Acid Methyl Esters (CP Mix, Supelco, Bellefonte, PA, USA)), а также по количеству введенного стандарта (дейтерометиловый эфир тридекановой кислоты) [5, 7].

Определен микробный пейзаж 14 больных с ограниченным стерильным панкреонекрозом и в сравнительном контексте – 18 условно здоровых людей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Динамика изменений концентрации микроорганизмов у оперированных больных с ограниченным стерильным панкреонекрозом представлена в таблице 1.

Таблица 1

Микробный пейзаж больных с ограниченным стерильным панкреонекрозом (оперированные) в различные периоды лечения (n = 14)

№	Микроорганизмы, кл/г × 10 ⁵	1. Здоровые	2. При поступлении	3. Середина лечения	4. При выписке	Норма
1	<i>Streptococcus</i> (оральные)	114,8 ± 26,1 [50–275] ³	129,1 ± 76,9 [0–305]	56,4 ± 49,5 [0–155]	77,0 ± 49,5 [14–140]	249
2	<i>Eubacterium lentum</i> (группа А)	56,3 ± 37,7 [95–74] ^{2,3,4}	424,5 ± 44,4 [0–982]	409,7 ± 93,0 [277–589]	291,5 ± 71,5 [220–363]	68
3	<i>Bacillus cereus</i>	27,5 ± 6,9 [0–64] ⁴	11,3 ± 7,0 [0–45]	12,4 ± 12,3 [0–37]	3,4 ± 3,3 [0–10]	23
4	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	0	2,8 ± 2,7 [0–11]	0	0	0
5	<i>Clostridium histolyticum</i>	39,7 ± 12,5 [2–116]	22,6 ± 22,5 [0–90]	0	0	95
6	<i>Nocardia</i> , 14:1d11	252,6 ± 56,2 [102–326]	258,0 ± 52,8 [164–403]	259,0 ± 42,8 [164–303]	262,0 ± 38,0 [224–300]	262
7	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	1,6 ± 1,5 [0–14] ²	520,8 ± 443,9 [0–1850]	258,0 ± 52,8 [0–1403]	0	0
8	<i>Moraxella</i> / <i>Acinetobacter</i>	3,0 ± 1,6 [2–10] ^{2,3}	18,3 ± 7,2 [0–35]	12,7 ± 6,4 [0–21]	4,1 ± 3,9 [0–8]	0
9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,4 ± 1,9 [2–20] ^{2,3,4}	58,3 ± 10,4 [29–74]	43,4 ± 22,0 [0–72]	19,5 ± 4,5 [15–24]	0
10	<i>Clostridium propionicum</i>	84,4 ± 32,9 [0–220]	56,4 ± 56,3 [0–169]	0	0	288
11	Актиномицеты	36,6 ± 4,9 [15–59]	31,3 ± 2,5 [26–36]	23,0 ± 4,0 [15–28]	21,0 ± 3,0 [7–25]	77
12	<i>Pseudonocardia</i>	24,2 ± 5,4 [6–60]	34,8 ± 23,4 [6–104]	16,0 ± 6,4 [6–28]	29,0 ± 8,4 [16–99]	70
13	<i>Streptomyces</i>	49,7 ± 13,7 [6–133] ²	72,8 ± 42,2 [9–193]	39,0 ± 17,3 [9–69]	29,0 ± 6,4 [6–98]	62
14	<i>Clostridium ramosum</i>	2234,3 ± 230,4 [1051–3241] ^{3,4}	2883,8 ± 559,2 [1908–4397] ^{3,4}	3967,3 ± 929,0 [2187–5318]	3811,5 ± 1188,5 [2623–5311]	2000
15	<i>Fusobacterium</i> / <i>Haemophilus</i>	3,7 ± 2,1 [0–18] ^{2,3,4}	25,5 ± 8,9 [0–41]	20,4 ± 10,2 [0–32]	28,5 ± 12,2 [6–63]	0
16	<i>Alcaligenes</i>	31,7 ± 4,4 [6–46] ^{2,3,4}	118,0 ± 20,2 [62–157]	119,3 ± 19,0 [67–157]	109,3 ± 15,0 [67–157]	48
17	<i>Rhodococcus</i>	283,7 ± 45,4 [63–512] ^{2,3}	490,0 ± 110 [212–751] ⁴	410,3 ± 90,1 [234–531]	240,3 ± 21,7 [200–298]	423
18	<i>Staphylococcus intermedius</i>	355,1 ± 72,9 [119–778] ²	842,3 ± 46,3 [11–1613] ⁴	444,0 ± 233,6 [139–903]	404,0 ± 233,6 [109–703]	756
19	Corineform CDC-group XX	125,9 ± 22,5 [32–250]	335,0 ± 17,0 [0–588]	341,3 ± 120,7 [0–588]	164,5 ± 12,7 [68–191]	605
20	<i>Lactobacillus</i>	5661,5 ± 1868,3 [965–16220]	4168,0 ± 2797 [581–9679]	3193,5 ± 2612,5 [581–5806]	4131,0 ± 969,0 [3062–5001]	6613
21	<i>Campylobacter mucosalis</i>	44,8 ± 16,8 [0–142] ^{2,3,4}	221,0 ± 64,7 [94–306]	204,3 ± 34,7 [143–263]	184,3 ± 14,7 [143–263]	99
22	<i>Mycobacterium</i> / <i>Candida</i>	106,8 ± 25,3 [0–239]	359,8 ± 110,9 [115–594]	275,5 ± 91,5 [169–549]	375,571,5 [169–549]	549
23	сем. <i>Enterobacteriaceae</i> (<i>E. coli</i> и пр.)	0,11 ± 0,01 [0–0,02]	57,6 ± 57,4 [0–230]	0	0	0
24	<i>Eubacterium moniliforme sbsp</i>	0	233,0 ± 232 [0–700]	0	0	0
25	<i>Cl. difficile</i>	80,2 ± 12,8 [43–155] ^{2,3,4}	439,3 ± 25,9 [83–944]	339,3 ± 23,9 [85–744]	299,0 ± 25,9 [222–376]	385
26	<i>Prevotella</i>	0	0	34,5 ± 11,5 [9–64]	0	38
27	<i>Eubacterium moniliforme</i> , <i>E. nodatum</i> , <i>E. sabureum</i>	6589,8 ± 1385,7 [1049–12508] ^{2,3,4}	17791,8 ± 5748,9 [3572–29580]	21329,3 ± 5745,3 [10278–29580] ⁴	10844,0 ± 1844,0 [9000–12688]	6912
28	<i>Staphylococcus</i>	123,0 ± 19,3 [57–220] ^{2,3}	396,0 ± 68,4 [264–581]	274,3 ± 22,4 [120–637]	124,3 ± 22,4 [120–237]	120
29	<i>Bifidobacterium</i>	2395,4 ± 453,5 [355–3973]	6701,3 ± 2571,4 [664–11533]	4129,5 ± 754,9 [2031–5374]	3023,0 ± 754,9 [2031–5374]	5067
30	<i>Helicobacter pylori</i> , h18	12,0 ± 2,5 [0–22] ^{2,4}	95,0 ± 48,5 [0–227] ^{1,3}	28,5 ± 14,3 [0–66] ^{2,4}	100,1 ± 17,3 [66–132]	14
31	<i>Clostridium perfringens</i>	19,6 ± 3,4 [4–35] ^{2,3,4}	49,3 ± 16,8 [24–97]	26,0 ± 7,2 [12–46]	36,0 ± 7,2 [12–46]	12
32	<i>Enterococcus</i>	1,9 ± 1,3 [0–11] ^{2,3,4}	61,8 ± 49,6 [0–208]	79,3 ± 70,4 [0–290]	42,3 ± 20,4 [3–71]	290
33	<i>Eubacterium</i>	0	0	0	0	59
34	<i>Propionibacterium spp</i> (<i>P. freudenreichii</i>)	2033,4 ± 339,1 [747–3305]	4150,0 ± 1536,9 [967–8078]	2967,0 ± 564,8 [965–4480]	2430,5 ± 564,8 [965–4480]	4480
35	<i>Streptococcus mutans</i> (анаэробные)	253,7 ± 45,8 [89–525] ^{2,3,4}	873,0 ± 261,4 [139–1340] ³	304,8 ± 63,2 [171–444]	584,8 ± 63,2 [171–444]	229
36	<i>Herpes</i>	60,4 ± 12,4 [19–112] ^{2,3,4}	366,3 ± 166,2 [65–740] ³	187,0 ± 45,7 [59–276]	287,0 ± 45,7 [59–276]	59
37	Микр. грибы, кампестерол	130,1 ± 27,5 [24–293] ^{3,4}	354,0 ± 112,5 [63–552]	308,0 ± 182,3 [29–842]	265,1 ± 182,3 [29–842]	842
38	<i>Nocardia asteroides</i>	287,3 ± 115,2 ^{2,4} [184–1194]	677,5 ± 112,5 [299–806]	641,5 ± 259,4 [201–1321]	541,5 ± 259,4 [201–721]	274
39	Цитомегаловирус	30,2 ± 3,7 [15–42] ^{2,3}	235,0 ± 67,4 [76–388]	230,2 ± 36,9 [46–426]	83,2 ± 36,9 [46–126]	166
40	Микр. грибы, ситостерол	130,1 ± 27,5 [24–293] ⁴	227,0 ± 86,8 [35–446]	166,8 ± 72,6 [82–384]	86,8 ± 22,6 [82–112]	384
41	<i>Ruminococcus</i>	372,6 ± 50,1 [119–547] ^{2,3,4,5}	1268,3 ± 363,2 [322–1997] ^{3,4}	673,5 ± 79,4 [485–869]	873,5 ± 79,4 [485–869]	640
42	<i>Actinomyces 10Me14</i>	165,4 ± 20,0 [95–260] ⁴	153,3 ± 37,3 [87–235] ⁴	129,5 ± 64,7 [34–309]	79,5 ± 14,7 [34–99]	309
43	<i>E. lentum</i> 7741 (группа В)	6,0 ± 20,1 [0–190] ^{2,3,4}	290,3 ± 86,4 [46–425] ^{3,4}	96,1 ± 27,5 [0–381]	86,1 ± 17,5 [0–181]	0
44	<i>Actinomyces viscosus</i>	503,4 ± 84,6 [165–855] ²	1309,0 ± 341,9 ⁴ [288–1719]	827,8 ± 154,9 [501–1190]	727,8 ± 154,9 [501–1190]	1190

Примечание. ^{2,3,4} – значимость различий (p < 0,05) между сроками лечения и определения ГХ-МС больных с ограниченным стерильным панкреонекрозом.

Нами установлено увеличение микробной флоры выше нормы, имеющее тенденцию к повышению у больных с ограниченным стерильным ПН, которым было выполнено хирургическое вмешательство: *Clostridium ramosum*, *Fusobacterium* / *Haemophilus*, *Helicobacter pylori* h18.

Отмечено снижение микроорганизмов от высоких до нормальных показателей: *Peptostreptococcus anaerobius*, *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus intermedius*, *Cl. difficile*, *Staphylococcus*, цитомегаловирус, *Actinomyces viscosus*.

Также выявлено, что концентрация следующих микроорганизмов имела тенденцию к снижению, однако, тем не менее, не достигла нормальных показателей: *Eubacterium lentum* (группа А), *Moraxella* / *Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter mucosalis*, *Eubacterium moniliforme*, *E. nodatum*, *E. sabureum*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus mutants* (анаэробные), *Herpes*, *Nocardia asteroides*, *Ruminococcus*, *E. lentum* 7741 (группа В).

Отмечена тенденция к уменьшению количества микроорганизмов в конце лечения, не превышавших нормальные показатели при госпитализации в следующих случаях: *Streptococcus* (оральные), *Bacillus cereus*, Актиномицеты, *Corineform* CDC-group XX, *Propionibacterium spp.* (*P. freudenreichii*), *Actinomycetes* 10Me14.

Выявлена недостаточность *Bifidobacterium* к концу лечения, что создает дисбиоз кишечника.

Таким образом, примененный метод газовой хроматографии масс-спектрометрии является перспективным методом диагностики микроорганизмов больных с острым панкреатитом, позволяет корректировать результаты комплексного лечения этих больных и требует дальнейших исследований в этой области.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Верховцева Н.В., Осипов Г.А. Свойства и трофические связи основных групп микроорганизмов отделов кишечника и фекалий по данным измерений микробных маркеров методом ГХ-МС // Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания. Современное состояние и перспективы. – М., 2004. – С. 20–21.

Verkhovtseva NV, Osipov GA (2004). Properties and trophic connections of main groups of microorganisms of intestine parts and feces according to the data of detecting of microbial markers using GC-MS [Svojstva i troficheskie svyazi osnovnykh grupp mikroorganizmov otdelov kishechnika i fekalij po dannym izmerenij mikrobnnykh markerov metodom GH-MS]. *Probiotiki, prebiotiki, sinbiotiki i funkcional'nye produkty pitaniya. Sovremennoe sostojanie i perspektivy*, 20-21.

2. Гельфанд Б.Р., Филимонов М.И., Бурневич С.З. Деструктивный панкреатит, доказательные методы диагностики и лечения. – М., 2010. – 12 с.

Gelfand BR, Filimonov MI, Burnevich SZ (2010). Destructive pancreatitis, evidence-based methods of diagnostics and treatment [Destrktivnyj pankreatit, dokazatel'nye metody diagnostiki i lechenija], 12.

3. Крымцева Т.А., Осипов Г.А., Бойко Н.Б., Соколов Я.А. и др. Минорные жирные кислоты биологических жидкостей урогенитальных органов и их значимость в диагностике воспалительных процессов // Журн. микроб. эпидем. иммун. – 2003. – № 2. – С. 92–101.

Krymtseva TA, Osipov GA, Boyko NB, Sokolov YA et al. (2003). Minor fatty acids of biological fluids of urogenital organs and their significance in the diagnostics of inflammatory processes [Minornye zhirnye kisloty biologicheskikh zhidkostej urogenital'nyh organov i ih znachimost' v diagnostike vospalitel'nyh processov]. *Zhurn. mikrob. jepidem. immun.*, 2, 92-101.

4. Полеско И.В., Бутов Ю.С., Осипов Г.А., Кабаева Т.И. и др. 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.

Polesko IV, Butov YS, Osipov GA, Kabaeva TI et al. (2007). Composition of sebum, skin and intestine microecology in patients with seborrheic dermatitis and acne (research using gas chromatography mass-spectrometry) [Sostav kozhnogo sala, mikrojekologija kozhi i kishechnika u bol'nyh seborejnym dermatitom i akne (issledovanie metodom gazovoj hromatografii mass-spektrometrii)]. *Ros. zhurn. kozh. i ven. bol.*, 2, 43-50.

5. Савельев В.С. Хирургические инфекции кожи и мягких тканей // Российские национальные рекомендации. – М., 2009. – С. 24–27.

Saveljev VS (2009). Surgical infections of skin and soft tissues [Hirurgicheskie infekcii kozhi i mjagkih tkanej]. *Rossijskie nacional'nye rekomendacii*, 24-27.

6. Хабиб О.Н., Белобородова Н.В., Осипов Г.А. Детектирование молекулярных маркеров бактерий в ткани клапанов сердца в норме и при патологии с применением метода газовой хроматографии и масс-спектрометрии // Журн. микроб. эпидем. иммун. – 2004. – Т. 7, № 3. – С. 62–65.

Habib ON, Beloborodova NV, Osipova GA (2004). Detection of molecular markers of bacteria in the cardiac valve tissue in normal and pathological condition using gas chromatography mass-spectrometry [Detektirovanie molekulyarnykh markerov bakterij v tkani klapanov serdca v norme i pri patologii s primeneniem metoda gazovoj hromatografii i mass-spektrometrii]. *Zhurn. mikrob. jepidem. immune.*, 7 (3), 62-65.

7. Brandtzaeg P, Bryn K, Kierulf P et al. (1992). Meningococcal endotoxin in lethal septic shock plasma studied by gas chromatography, mass-spectrometry, ultracentrifugation and electron microscopy. *J. Clin. Investig.*, 89, 816-823.

8. McNeil MM, Brown JM, Jarvis WR, Ajello L (1990). Comparison of species distribution and antimicrobial susceptibility of aerobic actinomycetes from clinical specimens. *Rev. Infect. Dis.*, 12 (5), 778-783.

9. Stead DE, Sellwood JE, Wilson J et al. (1992). Evaluation of a commercial microbial identification system based on fatty acid profiles for rapid, accurate identification of plant pathogenic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, 72, 315-321.

Сведения об авторах
Information about the authors

Дамбаев Георгий Цыренович – член-корр. РАН, заведующий кафедрой госпитальной хирургии Сибирского государственного медицинского университета

Dambaev Georgy Tsyrenovich – Corresponding Member of RAS, Head of the Department of Hospital Surgery of Siberian State Medical University

Саганов Владислав Павлович – доктор медицинских наук, заведующий кафедрой госпитальной хирургии Бурятского государственного университета (670042, г. Улан-Удэ, пр. Строителей, 1; тел.: 8 (3012) 55-62-58; e-mail: uromed-lkc@mail.ru)

Saganov Vladislav Pavlovich – Doctor of Medical Sciences, Head of the Department of Hospital Surgery of Buryat State University (pr. Stroiteley, 1, Ulan-Ude, Russia, 670042; tel.: +7 (3012) 55-62-58; e-mail: uromed-lkc@mail.ru)

Раднаева Лариса Доржиевна – доктор химических наук, профессор, заведующая кафедрой фармации Бурятского государственного университета, заведующая лабораторией химии природных систем Байкальского института природопользования СО РАН

Radnaeva Larisa Dorzhievna – Doctor of Chemical Sciences, Head of Department of Pharmacy of Buryat State University, Head of the Laboratory of Chemistry of Natural Systems of Baikal Institute of Nature Management SB RAS

Хитрихеев Владимир Евгеньевич – доктор медицинских наук, профессор, директор медицинского института Бурятского государственного университета

Khitrkheev Vladimir Yevgenyevich – Doctor of Medical Sciences, Professor, Director of Medical Institute of Buryat State University

Цыбиков Еши Нянюевич – доктор медицинских наук, профессор кафедры госпитальной хирургии медицинского института Бурятского государственного университета

Tsybikov Eshi Nyanyuevich – Doctor of Medical Sciences, Professor of the Department of Hospital Surgery of Medical Institute of Buryat State University