

# 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 [eloin@mail.ru](mailto:eloin@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 (кловидии, зубактерии), актинобактерий родов *Streptomyces*, *Nocardia* и дрожжей *Candida*. Далее по ранжировке 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, кловидии, 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* (*Eggertella 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).

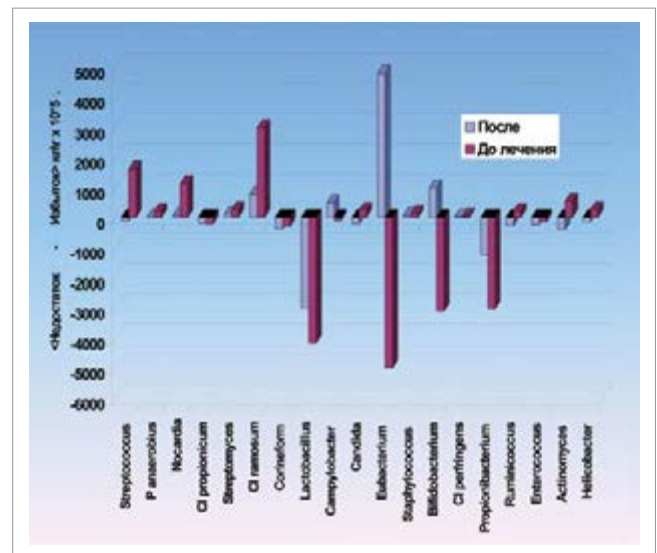


Рис. 1. Коррекция дисбактериоза

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    | 0     | 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  |



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 freudenti  | 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.

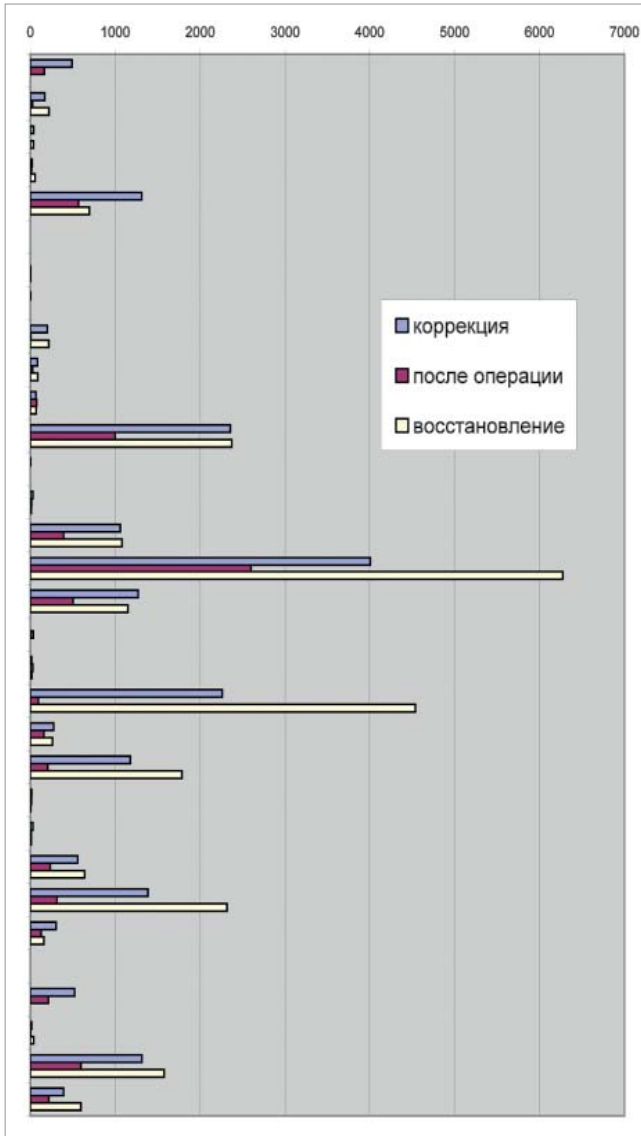


Рис. 2. Коррекция микроэкологического статуса пациентов

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 амоксиклав (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. Эндотоксикоз 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.