

4. Микробиологический мониторинг в системе инфекционного контроля неонатальных стационаров / Зубков В.В., Любасовская Л.А., Рюмина И.И. и др. // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2014. - №1. – С. 51–56.

Сведения об авторах

В.А. Панченко – студент

С.С. Смирнова – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник

Informations about the authors

V.A. Panchenko – student

S.S. Smirnova – Candidate of Sciences (Medicine), leading researcher

УДК: 616.34-008.87

РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА ЛЮДЕЙ РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР- СИСТЕМЫ «КОЛОНОФЛОР-16»

Дарья Александровна Проценко¹, Данила Леонидович Зорников², Екатерина Сергеевна Ворошилина³

¹⁻³ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет»

Минздрава России, Екатеринбург, Россия

¹dproschenko@yandex.ru

Аннотация

Введение. Последние годы значительное внимание исследователей направлено на изучение микробиоты человека, в частности микробиоты кишечника, и её связи с различными заболеваниями. Традиционный подход изучения качественного и количественного состава микробиоты толстой кишки предполагает, что её становление практически полностью завершается к 2-3 годам. Однако недавние исследования демонстрируют возможное более длительное формирование микробиоты. **Цель исследования** – оценка состояния микробиоты кишечника пациентов разных возрастных групп с использованием тест-системы «Колонофлор-16 (биоценоз)». **Материалы и методы.** Проведен анализ фекалий для определения состава микробиоты толстой кишки с помощью тест-системы «Колонофлор-16 (биоценоз)». В исследовании приняли участие 536 человек, которые были разделены на 5 возрастных групп (до 1 года, 2-3 года, 4-12 лет, 13-17 лет, 18 лет и старше). **Результаты.** Нарушения микробиоты были выявлены у 68,8-88,9% пациентов в зависимости от возрастной группы. **Обсуждение.** Были выявлены самые распространённые формы нарушений микробиоты во всех возрастных группах, включая снижение количества лактобацилл, анаэробный дисбаланс, снижение количества бифидобактерий, сопровождающиеся увеличением числа условно-патогенных микроорганизмов. **Выводы.** Выявлен дисбиоз толстой кишки во всех возрастных группах, общими чертами которого является анаэробный дисбаланс, снижение количества *Lactobacillus spp.* и увеличение количества условно-патогенных микроорганизмов.

Ключевые слова: микробиота, толстая кишка, Колонофлор-16.

THE ASSESMENT OF INTESTINAL MICROBIOTA AMONG DIFFERENT AGE GROUPS BY THE COLONOFLO-16 REAL-TIME PCR KIT

Daria A. Proshenko¹, Danila L. Zornikov², Ekaterina S. Voroshilina³

¹⁻³Ural state medical university, Yekaterinburg, Russia

¹dproshenko@yandex.ru

Abstract

Introduction. In recent years, considerable attention of researchers has been paid to the study of the human microbiota, particularly to the intestinal microbiota, and its relationship with various diseases. The traditional approach to studying the qualitative and quantitative composition of the colon microbiota suggests that its formation is almost fully completed by 2-3 years. The latest foreign studies demonstrate a possible longer formation of the microbiota. **The aim of the study** – to assess the state of the intestinal microbiota among patients of different age groups using the test system “Colonoflor-16 (biocenosis)”. **Materials and methods.** There has been made fecal analysis to determine the composition of the colon microbiota using the test system “Colonoflor-16 (biocenosis)”. The study involved 536 people who were divided into 5 age groups (under 1-year-old, 2-3 years old, 4-12 years old, 13-17 years old, over 18). **Results.** Microbiota disorders were detected in 68.8-88.9% of patients, depending on the age group. **Discussion.** The most frequent forms of microbiota disorders were identified in all age groups, including a decrease in the number of lactobacilli, anaerobic disbalance, a decrease in the number of bifidobacteria, accompanied by an increase in the number of opportunistic microorganisms. **Conclusions.** Colon dysbiosis was revealed in all age groups, the common features of which are anaerobic disbalance, a decrease in the number of *Lactobacillus* spp. and an increase in the number of opportunistic pathogens.

Keywords: microbiota, colon, Colonoflor-16.

ВВЕДЕНИЕ

Сегодня вполне обоснованно можно рассматривать организм человека как суперорганизм, совокупный геном которого представлен собственным геномом и микробиомом [1].

Понимание важности кишечного микробиома в различных физиологических процессах растет. В связи с этим становится все более актуальным определение профилактических или терапевтических подходов, нацеленных именно на микробиом кишечника.

Состав и функция кишечной микробиоты относительно хорошо описаны для младенцев (младше 3 лет) и взрослых, но в значительной степени упускается из внимания микробиом детей дошкольного и младшего школьного возраста, а также микробиом подростков.

До настоящего времени существовала точка зрения, что детская микробиота достигает количественного и качественного состава, соответствующего микробиоте взрослого человека, к возрасту 3 лет. Недавние исследования демонстрируют, что развитие микробиоты может занять больше времени [2]. Отклонения в процессе формирования микробиоты кишечника

могут иметь последствия для здоровья ребёнка в будущем. Поиск новых методов оценки микробиоты кишечника, позволяющих вовремя выявлять и предупреждать отклонения в ее составе, актуален для сохранения здоровья населения.

Комплексная оценка микробиоты кишечника в практическом здравоохранении ранее была возможна только с использованием культурального метода, в то время как основной пул научных данных получен с помощью молекулярно-генетических методов, преимущественно NGS. Доступным для клиницистов является отечественный набор реагентов для исследования микробиоты толстой кишки методом полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией в реальном времени (ПЦР-РВ) «КОЛОНОФЛОР».

Накоплен опыт использования теста «Колонофлор-16 (биоценоз)» у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, целиакией, псевдомембранозным колитом. Помимо ряда патогенных и условно-патогенных микроорганизмов (УПМ), традиционно определяемых и ассоциируемых с патологическими процессами, данный тест позволяет идентифицировать *Faecalibacterium prausnitzii*, иммунорегулирующий вид бактериоидов *Bacteroides thetaiotaomicron*, а также патобионты *Fusobacterium nucleatum* и *Parvimonas micra*. Отношение *Bacteroides fragilis* к *Faecalibacterium prausnitzii*, рассчитываемое по результатам теста, может рассматриваться как потенциальный биомаркер дисбиоза кишечника провоспалительного типа.

Цель исследования – оценка состояния микробиоты кишечника пациентов разных возрастных групп с использованием тест-системы «Колонофлор-16 (биоценоз)».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 536 человек, обратившихся в медицинский центр «Гармония» (г. Екатеринбург) с целью обследования у гастроэнтеролога в период с 1 января 2021 г. по 1 января 2022 г.

Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет Минздрава России (протокол № 5 от 26.06.2020). Все участники исследования подписали добровольное информированное согласие на проведение исследования.

Материалом для исследования были фекалии, которые пациенты собирали самостоятельно и доставляли в лабораторию в соответствии с разработанной инструкцией. Выделение ДНК из фекалий проводили набором реагентов ПРОБА-НК-ПЛЮС (ДНК-технология, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Оценка состава микробиоты толстой кишки производилась методом ПЦР-РВ с помощью тест-системы «Колонофлор-16 (биоценоз)» (компания «Альфалаб», Россия). По завершении амплификации специальное программное обеспечение, разработанное компанией «Альфалаб», автоматически генерирует интегральное лабораторное заключение, отражающее особенности качественного и количественного состава микробиоты кишечника, а также клинически значимые изменения.

Участники исследования были разделены на 5 возрастных групп: группа 1 – до 1 года (n=32); группа 2 – 2-3 года (n=41); группа 3 – 4-12 лет (n=48); группа 4 – 13-17 лет (n=9); группа 5 – 18 лет и старше (n=406).

Статистическую обработку результатов производили в программе IBM SPSS Statistics 26.0 (IBM Corp., США). Для оценки достоверности различий по частоте обнаружения разных типов дисбиотических состояний в отдельных возрастных группах использовали likelihood-ratio chi-square тест. Все различия интерпретировали как достоверные при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Тест-система «Колонофлор-16 (биоценоз)» позволяет автоматически сформировать заключение по количественному составу микроорганизмов и определить следующие состояния и клинически значимые изменения в микробиоте толстой кишки:

1. Отсутствие нарушений в составе микробиоты толстой кишки (соответствие количества выявляемых представителей нормальной микробиоты референтным значениям, заявленных в тест-системе «Колонофлор-16 (биоценоз)», выявление УПМ в допустимых значениях и отсутствие облигатно-патогенных микроорганизмов).

2. Снижение содержания облигатных представителей микробиоценоза (бифидобактерий и/или лактобацилл) без увеличения количества сапрофитной или условно-патогенной микрофлоры;

3. Снижение содержания бифидобактерий, сочетающееся с выраженными изменениями в аэробной микрофлоре – редукцией лактобацилл, появлением энтеропатогенных форм кишечной палочки, обнаружение одного или нескольких представителей патогенных микроорганизмов в высоких титрах;

4. Обнаружение в фекальных образцах в диагностически значимых количествах (более 10^4), грибов рода *Candida* и условно-патогенных бактерий (*Klebsiella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*);

5. Значительное снижение числа *Faecalibacterium prauznitzii* и, соответственно, изменение количественного соотношения *Bacteroides fragilis*/*Faecalibacterium prauznitzii* (анаэробный дисбаланс).

Результаты исследования фекальной микробиоты в исследуемых возрастных группах представлены в таблице 1.

Таблица 1

Частота выявления нормального варианта и нарушений фекальной микробиоты в разных возрастных группах

Тип дисбиоза	Группа 1 (n=32)	Группа 2 (n=41)	Группа 3 (n=48)	Группа 4 (n=9)	Группа 5 (n=406)	p
Норма	-	2,4%	4,1%	-	3,2%	0,614
Снижение содержания лактобацилл без	5 (15,6%)	1 (2,4%)	5 (10,4%)	2 (22,2%)	10 (2,5%)	0,845

увеличения числа УПМ						
Снижение содержания лактобацилл с увеличением числа УПМ	8 (25%)	9 (22%)	12 (25%)	3 (33,3%)	106 (26,1%)	0,657
Снижение содержания бифидобактерий и лактобацилл	-	-	-	1 (11,1%)	31 (7,6%)	0,717
Анаэробный дисбаланс без увеличения числа УПМ	3 (9,4%)	4 (9,7%)	6 (12,5%)	1 (11,1%)	52 (12,8%)	0,363
Анаэробный дисбаланс с ростом числа УПМ	10 (31,3%)	16 (39%)	10 (20,8%)	1 (11,1%)	127 (31,3%)	0,234
p рассчитан с помощью likelihood-ratio chi-square теста						

Во всех исследуемых группах в большинстве проб отмечали наличие дисбиотических нарушений: в группе 1 – 81,3%, группе 2 – 73,2%, группе 3 – 68,8%, группе 4 – 88,9%, группе 5 – 80,3%. При этом не было получено значимых различий по частоте обнаружения определенных вариантов нарушений микробиоты между исследуемыми возрастными группами.

В группе 1 частым нарушением являлось снижение количества *Lactobacillus spp.* (40,6% обследуемых). Анаэробный дисбаланс (количество бактероидов значительно превышает количество *F. prauznitzii*) наблюдался у 40,7% обследуемых, причём у значительной части – с увеличением числа УПМ. У детей первого года жизни чаще всего были выявлены такие УПМ, как *Clostridium difficile*, *Klebsiella pneumoniae* и *Klebsiella oxytoca*.

В группе 2 самой частой формой дисбиоза стал анаэробный дисбаланс (у 47,6% обследуемых), в основном сопровождающийся ростом числа УПМ.

В группе 3 у 45,8% обследуемых наблюдался рост УПМ, включающий снижение количества лактобацилл или анаэробный дисбаланс.

В группе 4 выявляли снижение количества лактобацилл с ростом числа УПМ у 33,3% обследуемых.

В группе 5 самой частой формой дисбиоза являлся рост УПМ – 57,4%, включая дефицит лактобацилл или анаэробный дисбаланс.

ОБСУЖДЕНИЕ

Около 90-98% микробиоты толстой кишки представлено облигатными анаэробами, такими как *Bacteroides* и *Bifidobacterium* (основная микробиота). Лактобактерии, пропионибактерии, кишечная палочка и энтерококки (сопутствующая микробиота) – 1-9% всей микробиоты толстой кишки.

Разделение контингента на 5 возрастных групп было обусловлено влиянием различных факторов на микробиоту кишечника. В течение первого года жизни ведущим фактором в формировании микробиоты можно считать грудное вскармливание; введение прикорма и постепенный переход к диете, аналогичной взрослой, существенно сказывается на микробиоте детей 2-3 лет. Группы детей дошкольного, младшего школьного возраста и подростки упускаются из отечественных исследований, хотя данный контингент заслуживает особого внимания ввиду запуска активных процессов роста и полового созревания.

Самым частым вариантом нарушения микробиоты кишечника во всех возрастных группах было обнаружение грибов рода *Candida* и условно-патогенных бактерий (*Klebsiella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*) в клинически значимых количествах. При этом у детей до 12 лет в основном выявлялись *Klebsiella* spp., *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, а у взрослых – *Staphylococcus aureus* и грибы рода *Candida*. Данные нарушения зачастую сопровождают антибиотик-ассоциированную диарею, иммунодефицитные состояния и являются этиологическим фактором развития воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК).

Повышенное значение отношения *Bacteroides* spp. к *Faecalibacterium prausnitzii* может рассматриваться в качестве индикатора дисбиоза толстой кишки провоспалительного типа. В исследованиях было показано, что уменьшение количества бутират-продуцирующих бактерий, которыми являются *Faecalibacterium prausnitzii*, может иметь патогенетическое значение при ВЗК [3].

По-видимому, изменение соотношения между ключевыми представителями двух важнейших групп анаэробных бактерий с увеличением доли бактероидов и соответственным уменьшением доли противовоспалительной *Faecalibacterium prausnitzii* характеризует дисбиоз кишечника, связанный с воспалительными процессами в организме человека (дисбиоз провоспалительного типа), а количественное значение этого отношения можно рассматривать в качестве потенциального биомаркера воспаления, локализация которого может быть различной.

Абсолютно во всех возрастных группах наблюдалось снижение количества лактобацилл. Чаще всего данное нарушение встречали у детей первого года жизни.

Недавние исследования демонстрируют предположение о возможном участии нормальной микробиоты кишечника в процессах, связанных с нарушением кишечного гомеостаза и развития ВЗК [4]. Если одни группы исследований демонстрируют значимое снижение количества *Lactobacillus* spp. у пациентов с ВЗК [5], то другие исследования показывают обратную связь [6]. На сегодняшний момент нет единой точки зрения о связи между количеством кишечных лактобацилл и развитием воспаления толстой кишки.

Дефицит бифидобактерий, способствующий нарушению углеводного обмена, снижению синтеза и усвоения витаминов, наблюдали реже во всех группах.

ВЫВОДЫ

1. В 68,8-88,9% исследуемых проб фекалий от пациентов различных возрастных групп отмечали наличие дисбиотических изменений.

2. Дисбиотические нарушения были преимущественно представлены повышением отношения *Bacteroides fragilis* к *Faecalibacterium prausnitzii*, снижением количества *Lactobacillus* spp. и увеличением количеств условно-патогенных микроорганизмов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Ситкин С.И., Вахитов Т.Я., Демьянова Е.В. Микробиом, дисбиоз толстой кишки и воспалительные заболевания кишечника: когда функция важнее таксономии // Альманах клинической медицины. – 2018. – №46. – С. 396–425.
2. Muriel Derrien, Anne-Sophie Alvarez, Willem M. de Vos. The gut microbiota in the first decade of life. *Trends in Microbiology*. – 2019; 27(12): 997-1010.
3. Schippa S, Conte MP. Dysbiotic events in gut microbiota: impact on human health. *Nutrients*. – 2014; 6(12): 5786-5805.
4. Yang Y., Jobin C. Novel insights into microbiome in colitis and colorectal cancer. *Curr Opin Gastroenterol*. – 2017; 33(6): 422-427.
5. Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature*. – 2007; 449(7164): 811-818.
6. Osipov GA, Verkhovtseva NV. Study of human microecology by mass spectrometry of microbial markers. *Benef Microbes*. – 2011; 2(1): 63–78.

Сведения об авторах

Д.А. Прощенко – старший преподаватель

Д.Л. Зорников – кандидат медицинских наук, доцент

Е.С. Ворошилина – доктор медицинских наук, профессор

Information about the authors

D.A. Proshchenko – Assistant Professor

D.L. Zornikov – Candidate of Science (Medicine), Associate Professor

E.S. Voroshilina – Doctor of Science (Medicine), Professor

УДК: 614.47

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ И ИММУНОГЕННОСТИ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН ЧЕТЫРЕХВАЛЕНТНОЙ «УЛЬТРИКС® КВАДРИ» И ТРЕХВАЛЕНТНОЙ «УЛЬТРИКС®» У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН В II И III ТРИМЕСТРАХ

Наталья Алексеевна Пучкова¹, Виктор Васильевич Романенко², Наталья Алексеевна Цуканова³

^{1,2}ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург, Россия

³ГАУЗ СО «Центральная городская больница №7», Екатеринбург, Россия

¹Puchkova_NA@66.rospotrebnadzor.ru