УДК 616-008.87-053.2:576.8

ВЗАИМОСВЯЗЬ МИКРОБИОТЫ РАЗЛИЧНЫХ БИОТОПОВ У ДЕТЕЙ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ

Самоукина А.М.[1], Алексеева Ю.А.[1], Михайлова Е.С.[1], Денисова Е.В.[1], Жуков С.В.[1]

[1]*ФГБОУ ВО «Тверской ГМУ» Минздрава России, Тверь, e-mail: anna_samoukina@mail.ru*

Проведен анализ взаимосвязи качественных и количественных параметров микробиоты, включая вирусологический компонент, различных биотопов у детей. Микробиота оценивалась в возрастном аспекте в норме и при патологических состояниях с использованием бактериологических и молекулярно-генетических методов. Установлено, что у детей различных возрастных групп микробиота пищеварительного тракта имеет ряд взаимообусловленных характеристик, а именно сходный спектр представителей условно-патогенной микрофлоры (Staphylococcus spp., Candida spp. и др.) на фоне снижения количества нормофлоры. Микробиота включала вирусологический компонент, представленный, в частности, герпесвирусами. Показано, что вирусологический компонент (вирус Эпштейна-Барр, герпеса 6 типа и их ассоциации) микробиоты полости рта у здоровых детей находится в тесной динамической взаимосвязи с качественными и количественными параметрами бактериально-грибковой микрофлоры. Количество представителей герпесвирусов и их ассоциаций нарастало по мере снижения содержания представителей нормальной микрофлоры и увеличения количества условно-патогенной микрофлоры. Выявлена тесная взаимосвязь формирования бактериально-грибково-вирусных ассоциаций и состояния локальной иммунной резистентности. Так, при нарастании микроэкологических изменений наблюдалась тенденция к снижению уровня лизоцима на фоне увеличения секреторного Ig A, сопровождающегося уменьшением авидности антител. У новорожденных с внутриутробной инфекцией удельный вес стафилококков оставался на стабильно высоком уровне, но отмечалось снижение доли S. aureus и, напротив, увеличение значимости S.epidermidis, что делает возможным использование этих микроорганизмов в качестве «биомаркеров» микроэкологического неблагополучия.

Ключевые слова: дети, микробиота, вирусологический компонент, локальная иммунная резистентность.

INTERRELATION OF VARIOUS BIOTOPES MICROBIOTA IN HEALTHY CHILDREN AND CHILDREN WITH PATHOLOGICAL CONDITIONS

Samoukina A.M.[1], Alekseeva Y.A.[1], Michaylova E.S.[1], Denisova E.V.[1], Zhukov S.V.[1]

[1]*Tver State Medical University, Tver, e-mail: anna_samoukina@mail.ru*

The interrelation of qualitative and quantitative parameters of various biotopes microbiota including the virological component, in children was analyzed. The microbiota was evaluated in the age aspect in normal and pathological states using bacteriological and molecular-genetic methods. It has been established that in children of different age groups the digestive tract microbiota has a number of interdependent characteristics, namely a similar spectrum of representatives of the opportunistic microflora (Staphylococcus spp., Candida spp., Etc.) against the background of a decrease in the amount of normoflora. The microbiota includes a virological component represented, in particular by herpesviruses. It is shown that the virological component (Epstein-Barr virus, Herpesvirus type 6 and their associations) of oral microbiota in healthy children is in close dynamic relationship with the qualitative and quantitative parameters of the bacterial-fungal microflora. The number of representatives of herpesviruses and their associations increased as the content of normal microflora decreased and the number of conditionally pathogenic microflora increased. A close relationship between the formation of bacterial-fungal-viral associations and the state of local immune resistance was revealed. Thus, with the growth of microecological changes, there was a tendency to decrease the level of lysozyme against the background of an increase in secretory Ig A, accompanied by a decrease in antibody avidity. In neonates with intrauterine infection, the proportion of staphylococci remained at a consistently high level, but there was a decrease in the proportion of S. aureus, and, on the contrary, an increase in the significance of S.epidermidis, which makes it possible to use these microorganisms as "biomarkers" of microecological changes.

Keywords: children, microbiota, virological component, local immune resistance.

Микрофлора организма человека, представленная облигатной и факультативной микрофлорой, находится в тесной динамической взаимосвязи с состоянием общей и

локальной иммунной резистентности, отражающей уровень здоровья человека в целом [1]. Механизмы реализации защитной функции нормомикробиоты многообразны и включают выработку антибиотикоподобных субстанций, органических кислот, перекисных соединений, а также нуклеолитических ферментов, растворяющих вирусную нуклеиновую кислоту [2; 3]. Уменьшение количества эндосимбионтных бактерий приводит к непосредственному взаимодействию вирусов с человеком и, как следствие, нарушению основных биологических условий функционирования организма и развитию патологических состояний [4; 5].

Микробиота организма человека включает различных представителей мира микробов и представлена бактериями, вирусами, простейшими, грибами [6]. Компоненты микробиоты существуют во взаимодействии и взаимовлиянии, что проявляется особенностями качественных и количественных параметров микробиоты отдельно взятых биотопов (полость рта, желудок, толстый кишечник и др.) у детей различного возраста и уровня здоровья [7]. Снижение количества представителей индигенной микрофлоры, выполняющей функцию колонизационной резистентности, также оказывает влияние на поддержание гомеостаза [8].

В последние годы наблюдается выраженная тенденция к увеличению заболеваемости вирусными инфекциями, что связано с действием большого количества эндогенных и экзогенных факторов. В частности, с массивным использованием антибактериальных препаратов для лечения ряда заболеваний, получения высоких результатов в животноводческом и птицеводческом производстве, бесконтрольного самолечения, что и приводит к изменениям нормомикробиоты, характеризующимся снижением количества эндосимбионтов [2; 9].

Состояние микробиоты пищеварительного тракта, как наиболее многочисленной микроэкологической ниши, может быть использовано в качестве интегрального показателя для оценки состояния здоровья в целом. Количественные и качественные параметры условно-патогенной микрофлоры (УПМ) пищеварительного тракта, в частности ее избыточный рост, могут выступать в роли «микробных маркеров» микроэкологического неблагополучия [1; 10].

Учитывая вышеизложенное, целью исследования явилось изучение взаимосвязи качественных и количественных параметров микробиоты различных биотопов, включая вирусологический компонент, у детей для выделения групп риска по развитию микроэкологических изменений на этапе донозологической диагностики и разработки методов превентивной коррекции.

Материалы и методы

Для оценки микробиоты различных биотопов у здоровых детей и при патологических состояниях в разных возрастных периодах были сформированы следующие группы респондентов. В первую группу обследования вошли 70 новорожденных первого месяца жизни (36 мальчиков, 34 девочки) с внутриутробной инфекцией (ВУИ), находившихся на госпитализации и обследованных в соответствии со стандартами ведения пациентов. Вторая группа обследования включала 44 ребенка в возрасте 12-16 лет, которые были отнесены к I-II группе здоровья (Приказ Минздрава РФ № 621 от 30.12.2003). Кроме того, проведено пилотное исследование микрофлоры полости рта, желудка, конечного отдела пищеварительного тракта (фекалии) у 3 новорожденных с экстремально низкой массой тела, которые составили третью группу обследования. В трех группах респондентов была проведена оценка качественных и количественных параметров микробиоты в различных биотопах (полость рта, желудок, толстый кишечник, моча, слизистая глаз, кровь). У всех респондентов получено информированное согласие на обследование и сбор материала. Проведение исследования одобрено Этическим комитетом ФГБОУ ВО «Тверской ГМУ» Минздрава России (протокол № 7 от 25.12.17 г.).

Все дети были осмотрены педиатром, терапевтом и узкими специалистами (неонатолог, стоматолог, отоларинголог, хирург, эндокринолог), проведены ряд функциональных исследований с учетом возрастных аспектов.

Для оценки бактериального компонента микробиоты проведено бактериологическое исследование ротовой жидкости, содержимого желудка, просветной микрофлоры толстого кишечника, материала из зева, слизистой глаз, мочи в соответствии с нормативными документами. Для определения варианта нормомикробиоценоза пищеварительного тракта использовали методику оценки микробиоты пищеварительного тракта по микрофлоре ротовой жидкости (патент на изобретение № 2602697 от 03.03.15). Для определения вирусологического компонента микробиоты полости рта проведено молекулярно-генетическое исследование ротовой жидкости.

Для определения состояния иммунной резистентности в ротовой жидкости были исследованы уровни лизоцима (турбодиметрия), секреторного IgA и авидности антител с использованием иммуноферментного анализа («Вектор-Бест»).

Статистическую обработку результатов клинических и лабораторных исследований проводили с помощью программных пакетов Microsoft Office Excel (2007) и Statistica (10.0) для Windows (Statsoft Inc., USA).

Результаты и обсуждение

При обследовании новорожденных первого месяца жизни с ВУИ в различных биотопах был выявлен широкий спектр представителей УПМ. В ходе бактериологического

исследования выделены представители родов: Staphylococcus (S.aureus, S.epidermidis, S.haemolyticus, S.saprophyticus), Klebsiella (K.pneumoniae, K.oxytoca, K. rhinoscleromatis), Enterobacter (E.cloacae, E.aerogenes), Enterococcus (E.faecalis, E.faecium), неферментирующие грамотрицательные палочки Acinetobacter (A.calcoaceticus, A.Iwoffii, A.haemolyticus, A.baumanni), дрожжеподобные грибы рода Candida (C.albicans, C.glabrata), E.coli и негемолитические представители рода Streptococcus.

В ходе настоящего исследования в 62% были выделены представители рода Staphylococcus из них: S.epidermidis в 45,2%, S.haemolyticus – 38,6%, S.saprophyticus – 9,7%, S.aureus – 6,5%. Также лидирующую позицию заняли представители рода Candida - 52%, из них C.albicans – 69,2%, C.glabrata – 30,8%. Вторые по частоте встречаемости были бактерии рода Acinetobacter - 16%, из них A.calcoaceticus, A.haemolyticus в 37,5%, а A.Iwoffii, A.baumanni - 12,5% случаев. Представители рода Klebsiella обнаружены в 12% случаев, из них K.pneumoniae в 66,7%, K.oxytoca, K. rhinoscleromatis – в 16,7% случаев. Представители родов Enterobacter, Escherichia, Enterococcus и Streptococcus были выявлены лишь в 4-6% случаев. Следует отметить, что в 25% случаев были выявлены ассоциации представителей УПМ. Количество штаммов УПМ в различных ассоциациях колебалось от 2 до 4.

В материале из зева, содержимого желудка и со слизистой глаз преобладали представители родов Staphylococcus и Acinetobacter. В моче и кале новорожденных с ВУИ наиболее часто определялись представители рода Candida. Кроме того, в моче новорожденных с ВУИ были идентифицированы представители родов Enterococcus, Enterobacter и Escherichia, которые участвовали в формировании патомикробиоценоза.

При определении чувствительности к антибактериальным препаратам было обнаружено, что большинство представителей УПМ различных биотопов обладали широким спектром чувствительности, включая представителей родов Staphylococcus, Acinetobacter, Escherichia, Enterobacter. Напротив, представители родов Klebsiella и Enterococcus обладали полирезистентностью к антибактериальным препаратам в 80% случаев, что указывает на госпитальное происхождение этих штаммов. Кроме того, у 27 (55,1%) новорожденных в различных биотопах были выявлены одни и те же представители УПМ, имеющие сходную антибиотикограмму. Это может свидетельствовать о потенциальной способности представителей УПМ к транслокации через естественные барьеры и диссеминации на фоне незрелости иммунной системы, несостоятельности механизмов специфической и неспецифической иммунной резистентности, реализуемые посредством клеточных и гуморальных механизмов.

По результатам ранее проведенных исследований [6; 10] было установлено, что микробиота начального и конечного отделов пищеварительного тракта у детей

подросткового возраста имеет ряд взаимообусловленных характеристик, несмотря на различие спектра населяемых эти биотопы микроорганизмов. Это сходство заключалось в выявлении идентичных представителей УПМ, «микробных маркеров» микроэкологического неблагополучия, которые определялись на фоне снижения количества представителей нормомикробиоты. В данной группе обследования было проведено определение микроэкологического варианта микробиоты пищеварительного тракта по микрофлоре ротовой жидкости, характеризующегося определенным сочетанием облигатной и факультативной микрофлоры (патент на изобретение № 2602697 от 03.03.15). Выявлено, что среди подростков наиболее благоприятный первый вариант встречался в 38,6%, второй – 47,7% и третий – 13,7% случаев.

Изучение вирусологического компонента микробиоты полости рта во второй группе обследования позволило выявить ДНК представителей герпесвирусов в ротовой жидкости здоровых детей. Вируспозитивные образцы составили 43,2% случаев, из них ДНК вируса Эпштейна-Барр была обнаружена в 15,9% случаев, ДНК вируса герпеса 6 типа - в 34,1%, ассоциация этих вирусов - в 11,4% случаев. ДНК цитомегаловируса, вирусов простого герпеса 1 и 2 типов не выявлена.

При сопоставлении параметров бактериального и вирусного компонентов полости рта у здоровых детей был выявлен ряд особенностей. Вируспозитивные образцы выявлены в 29,4, 42,8 и 83,3% соответственно для первого, второго и третьего микроэкологического варианта нормомикробиоты. ДНК вируса Эпштейна-Барр была обнаружена в 17,6, 23,8 и 50%, а ДНК вируса герпеса 6 типа - в 23,5, 38,1 и 67,7% для первого, второго и третьего варианта соответственно. Было выявлено, что количество вируспозитивных образцов достоверно выше ($p \leq 0,05$) у лиц с третьим вариантом по сравнению с первым и вторым. Частота выявления ДНК вируса Эпштейна-Барр и вируса герпеса 6 типа была достоверно выше ($p \leq 0,05$) у лиц с третьим вариантом по сравнению с первым. Следовательно, наблюдалось увеличение количества представителей семейства герпесвирусов на фоне нарастания микроэкологических изменений в бактериальном звене. Для первого, второго и третьего варианта микробиоты (таблица) обнаружены ассоциации представителей герпесвирусов, которые достоверно преобладали у лиц со вторым и третьим вариантом бактериальной нормомикробиоты (в 11,8, 23,8 и 33,3% случаев соответственно).

Вирусологический компонент микробиоты полости рта у здоровых детей при различных вариантах бактериальной микрофлоры

Вирусы микробиоты	Вариант нормомикробиоценоза					
	Первый n=17		Второй n=21		Третий n=6	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Вируспозитивные	5	29,41	9	42,86*	5	83,33**
Эпштейна-Барр	3	17,65	5	23,81	3	50,00**
Герпеса 6 типа	4	23,53	8	38,10	3	50,00**
Ассоциация вирусов	2	11,76	5	23,81*	2	33,33**

* достоверность различий между показателями 1-го и 2-го вариантов соответствует $p \leq 0,05$;
** достоверность различий между показателями 1-го и 3-го вариантов соответствует $p \leq 0,05$.

При исследовании показателей локальной иммунной резистентности полости рта здоровых детей (вторая группа обследования) было выявлено, что уровень лизоцима находился в пределах референсных значений в 87,8% и в среднем составил 22±0,54 мкг/мл. Уровень секреторного IgA был выше нормального уровня в 68,3% случаев, средний уровень составил 0,33±0,03 мг/мл. Среднее значение авидности антител составило 74,6±2,8%.

Сопоставление показателей локальной иммунной резистентности полости рта у здоровых детей показало, что при нарастании микроэкологических изменений (второй и третий вариант нормомикробиоценоза) наблюдалась тенденция к снижению уровня лизоцима на фоне увеличения секреторного Ig A, сопровождающегося уменьшением авидности антител, что указывает на взаимосвязь микроэкологии и локальной иммунной резистентности.

В рамках настоящей работы было проведено пилотное исследование различных биотопов пищеварительного тракта у новорожденных с экстремально низкой массой тела. В связи с возрастным аспектом (первый месяц жизни), особенностями онтогенеза (экстремально низкая масса тела при рождении), поиск закономерностей формирования нормо- и патомикробиоценоза, профилей микробного заселения представляется достаточно сложной задачей, что связано также с незрелостью иммунной системы, влияния целого ряда экзогенных факторов (пребывание в стационаре, кормление через зонд, врачебные манипуляции). Тем не менее проведенное исследование показало, что у детей данной группы в различных отделах пищеварительного тракта наблюдалась та же закономерность, что и у детей подросткового возраста: для респондентов третьей группы обследования было характерно наличие идентичных представителей УПМ в различных биотопах пищеварительного тракта на фоне снижения количества представителей нормофлоры. Так, у первого ребенка был выявлен S.aureus в полости рта, желудке и кале в количестве 2,0, 1,0 и 6,7 lgКОЕ/мл соответственно. В полости рта и кале была выявлена C.krusei в количестве 5,0

и 4,7 lgКОЕ/мл соответственно, E.coli в содержимом желудка и кале в количестве 3,0 lgКОЕ/мл. Количество представителей родов Bifidobacterium и Lactobacillus во всех исследуемых биотопах были снижены (менее 3,0 lgКОЕ/мл). У второго ребенка в начальном и конечном биотопах пищеварительного тракта были выявлены представители рода Staphylococcus (S.epidermidis) в количестве 4,0 и 6,0 lgКОЕ/мл соответственно на фоне снижения количества бифидобактерий и лактобацилл. У третьего ребенка были выявлены более выраженные микроэкологические изменения, характеризующиеся наличием S.aureus, P.aeruginosa и Candida spp. в количестве от 1,0 до 6,0 lgКОЕ/мл на фоне еще более выраженного снижения количества облигатной микрофлоры.

Заключение

Таким образом, было установлено, что микробиота различных отделов пищеварительного тракта у детей различных возрастных групп имеет ряд взаимообусловленных характеристик, в частности сходный спектр представителей УПМ (Staphylococcus spp., Candida spp. и др.) на фоне снижения количества нормофлоры. Микробиота полости рта у здоровых детей включает вирусологический компонент, представленный, в частности, герпесвирусами (вирус Эпштейна-Барр, герпеса 6 типа) и их ассоциациями. Показано, что вирусологический компонент микробиоты находится в тесной динамической взаимосвязи с качественными и количественными параметрами бактериально-грибковой микрофлоры. Количество представителей герпесвирусов и их ассоциаций нарастало по мере снижения содержания представителей нормальной микрофлоры и увеличения количества УПМ. Показано, что существует тесная взаимосвязь формирования бактериально-грибково-вирусных ассоциаций и состояния локальной иммунной резистентности. У новорожденных с ВУИ удельный вес стафилококков оставался на стабильно высоком уровне, но отмечалось снижение доли S. aureus и, напротив, увеличение значимости S.epidermidis, что делает возможным использование этих микроорганизмов в качестве «биомаркеров» микроэкологического неблагополучия.

Раннее выявление взаимосвязанных микроэкологических изменений в отдельных биотопах у детей с различным уровнем здоровья позволяет сформировать группы риска на этапе донозологической диагностики и провести своевременный персонифицированный подбор пробиотиков, с целью коррекции кишечной микробиоты, для формирования адекватного профиля микробного заселения.

Список литературы

1. Чернин В.В. Симбионтное пищеварение человека. Физиология. Клиника, диагностика

и лечение его нарушений / В.В. Чернин, А.И. Парфенов, В.М. Бондаренко и др. - Тверь: Триада, 2013. - 232 с.

2. Захарова И.Н. Современные представления о микробиоте кишечника. Мифы и факты // Материалы научно-практического семинара кафедры педиатрии ФГБОУ ДПО «РМАНПО» МЗ РФ. – М., 2018. – С. 8-11.

3. Ардатская М.Д. Дисбиоз (дисбактериоз) кишечника: современное состояние проблемы, комплексная диагностика и лечебная коррекция / М.Д. Ардатская, С.В. Бельмер, В.П. Добрица и др. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. - 2015. - № 5. - С. 13-50.

4. Buccigrossi V. Functions of intestinal microflora in children / V. Buccigrossi, E. Nicastro, A. Guarino // Curr. Opin. Gastroenterol. – 2013. – Vol. 29, №. 1. – P. 31-39.

5. Черешнев В.А. Экология. Иммунитет. Здоровье. – СПб.: СПбГУП, 2016. – 32 с.

6. Давыдов Б.Н. Варианты микрофлоры ротовой жидкости у практически здоровых детей и подростков / Б.Н. Давыдов, А.М. Самоукина, Е.С. Михайлова и др. // Стоматология. – 2017. – № 1. – С. 56-59.

7. Sassone-Corsi M. No vacancy: how beneficial microbes cooperate with immunity to provide colonization resistance to pathogens / M. Sassone-Corsi, M. Raffatellu // The Journal of Immunology. – 2015. – Vol. 194, №. 9. – P. 4081-4088.

8. Taspinar M. HHV-6 is ubiquitously found using Western blot in tonsils and adenoid tissues of healthy people / M. Taspinar, N. Cetin, D. Gerceker et al. // New Microbiology. – 2013. – Vol. 36, № 3. – P. 251-257.

9. Ly M. Altered oral viral ecology in association with periodontal disease / M. Ly, S.R. Abeles, T.K. Boehm et al. // Microbiology. – 2014. – Vol. 5, №. 3. – P. 1133-1147.

10. Микробиота пищеварительного тракта как системный фактор оценки здоровья человека и проведения превентивной коррекции / А.М. Самоукина, Е.С. Михайлова, В.В. Чернин и др. // Лечение и профилактика. – 2015. – № 3. – С. 23-28.