

На правах рукописи

Гудова Наталья Владимировна

**Изучение микробиоценоза ротоглотки у детей методом микробиом-
ассоциированной метаболомики**

1.5.11 - микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой
степени кандидата биологических наук

Москва - 2023

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель:

доктор биологических наук Затевалов Александр Михайлович

Официальные оппоненты:

Тец Виктор Вениаминович

доктор медицинских наук, профессор, академик РАЕН, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии и вирусологии имени академика Д.К. Заболотного, заведующий кафедрой

Червинец Вячеслав Михайлович

доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тверской государственной медицинской академии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии, профессор кафедры

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится « _____ » _____ 2023 года в ____ часов на заседании диссертационного совета 64.1.004.01 в Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и на сайте www.gabrich.ru.

Автореферат разослан « _____ » _____ 2023 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Борисова Ольга Юрьевна

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Распространенность респираторных заболеваний остается серьезной медико-социальной проблемой, решение которой тесно связано с изучением микробиоценоза верхних дыхательных путей. Высокая среднемноголетняя заболеваемость острыми инфекциями верхних дыхательных путей множественной и неуточненной локализации (21 тыс. на 100 тыс. населения РФ за 2010–21 гг.) является причиной ухудшения качества жизни населения и значительного экономического ущерба. Ежегодно острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) и грипп, на долю которых приходится более 90% от всей регистрируемой инфекционной заболеваемости, наносят экономический ущерб более 500 млн рублей, что составляет 80% от всего ущерба, наносимого инфекционными болезнями (Белов А.Б. и др., 2002; Shinde V. et. al., 2009).

Самые высокие показатели заболеваемости ОРВИ, в том числе гриппом, отмечены среди детей в возрастных группах 1-2 года (97356,71 на 100 тыс. населения этого возраста) и 3-6 лет (95071,80). Изучение особенностей микробиоценоза ротоглотки в группе часто болеющих детей является актуальной задачей, так как на эту группу приходится до 80% заболеваний острыми респираторными вирусными инфекциями. За счет сниженной колонизационной резистентности и нарушений иммунологической системы для группы часто болеющих детей характерна высокая частота встречаемости осложнений острых респираторных вирусных инфекций в виде внебольничных пневмоний (1337,49 на 100 тыс. детей в возрастной группе 1-2 года). Сохраняется тенденция полиэтиологичности пневмоний. В 2021 году наибольший вклад вносили пневмонии, вызванные вирусами (в том числе COVID-19) (265,06 на 100 тыс. населения) (Соминина А.А. и др., 2004; Александрова М.А. и др., 2006; Государственный доклад Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2021, 2022).

Лабораторная диагностика острых респираторных заболеваний (ОРЗ), основанная в первую очередь на бактериологических и молекулярно-генетических методах исследования, малоэффективна из-за большого числа этиологических агентов. В связи с этим эффективная адекватная этиотропная терапия назначается не всегда и порой в поздние сроки (Алешкин В.А. и др., 2015; WHO, 2001). Затруднения, связанные с определением этиологического агента заболевания и дальнейшей стратегией лечения, заключаются в отсутствии быстрого и эффективного скринингового метода диагностики.

Анализ современных тенденций медицинской науки демонстрирует особое внимание к эффективным интегральным методам изучения микробиоценозов различных локусов – омик-технологиям. Исследование концентраций метаболитов микроорганизмов многофакторным анализом и математическим моделированием позволяет расширить возможности предиктивной, скрининговой диагностики острых респираторных вирусных инфекций и их осложнений за счет использования информационного потенциала сложных живых систем.

Степень разработанности темы исследования

До недавнего времени основным методом изучения состояния микробиоценоза нестерильных полостей человека, в том числе ротоглотки, являлось классическое бактериологическое исследование. Возможности бактериологического исследования имеют некоторые ограничения по набору определяемых микроорганизмов. Также данное исследование не дает информации о функциональной активности микрофлоры, что имеет важное клиническое значение (Macfarlane G.T. et. al., 2008; Ткаченко Е.И. и др., 2013; Besten G. et. al., 2013; Ситкин С.И. и др., 2015).

Для диагностики респираторных вирусов используется метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), который определяет присутствие вируса по специфическому фрагменту дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или рибонуклеиновой кислоты (РНК) возбудителя.

Серьезной проблемой в педиатрической практике является своевременное выявление и лечение детей с повторными заболеваниями дыхательных путей. В последние десятилетия проведено большое количество исследований, целью которых было определение критериев включения ребенка в группу часто болеющих детей (ЧБД). Критерии были разработаны в результате изучения видового состава микрофлоры и популяций иммунных клеток (Альбицкий В.Ю. и др., 1986; Jartti T., 2008; Лутовина О.В. и др., 2009; Izumo T. et. al., 2010; Коровина Н.А. и др., 2011; Jesenak M. et. al., 2011; Jesenak M. et. al., 2014; Bassis C.M. et. al., 2015; Mansilla E. et. al., 2016).

Использование метаболитов для предиктивной диагностики заболеваний было предложено в 1999 году J.K. Nicholson, который утверждал, что вся информация о функциональном состоянии организма содержится в его биологических жидкостях.

Изучение микробиоценоза ротоглотки стало важным этапом в понимании развития респираторного заболевания, восстановления здоровья после перенесенной инфекции и формирования склонности к повторным заболеваниям.

Вышеизложенное свидетельствует об актуальности дальнейшего изучения функциональной активности микробиоценоза ротоглотки методами микробиом-ассоциированной метаболомики, которое будет строиться на изучении специфических соотношений концентраций короткоцепочечных жирных кислот в слюне, для предиктивной диагностики возбудителя острого респираторного заболевания, а также для определения критериев, позволяющих отнести ребенка в группу часто болеющих детей, для обеспечения своевременности и эффективности профилактических и лечебных мероприятий.

Цель исследования - оценка функционального состояния микробиоценоза ротоглотки детей, в том числе для этиологической расшифровки острых респираторных заболеваний, методом микробиом-ассоциированной метаболомики.

Задачи исследования:

1. Изучить особенности и определить критерии функциональной активности микробиоценоза ротоглотки у людей. Рассчитать референсные значения концентраций короткоцепочечных жирных кислот в слюне у детей в возрасте от 4 месяцев до 14 лет.

2. Разработать математические модели оценки дисбиотических изменений микробиоценоза ротоглотки у детей, связанных с высокой бактериальной колонизацией, присутствием респираторного вируса и принадлежностью ребенка к группе часто болеющих детей. Определить показатели прогностической точности, специфичности и чувствительности разработанных моделей.

3. Провести интегральную оценку микробиоценоза ротоглотки у пациентов детского возраста с острым бронхитом и острой внебольничной пневмонией, а также детей групп часто болеющих и эпизодически болеющих в острой фазе респираторного заболевания с использованием бактериологических, молекулярно-генетических, биохимических методов исследования и разработанных математических моделей.

4. Разработать на основе показателей функциональной активности микробиоценоза ротоглотки компьютерную программу для выявления дисбиотических изменений у детей, связанных с высокой бактериальной колонизацией и/или наличием респираторного вируса, а также для определения возможной принадлежности ребенка к группе часто болеющих детей.

Научная новизна исследования

Впервые определены критерии нарушений функциональной активности микробиоценоза ротоглотки по концентрациям короткоцепочечных жирных кислот в слюне людей трех возрастных групп (до 4 месяцев, с 4 месяцев до 14 лет, старше 14 лет).

Наиболее чувствительными к изменениям структуры микрофлоры ротоглотки являются структурный индекс (функциональная активность индигенной микрофлоры ротоглотки) и индекс изокилот (протеолитическая активность микрофлоры ротоглотки). Структурный

индекс увеличивается единожды в 14 лет. Индекс изокислот снижается в 1,7 раза — в 4 месяца, и еще в 2,4 раза — в 14 лет. Микробный состав микробиоценоза ротоглотки также соответствует возрастным особенностям для каждой из трех установленных возрастных групп, в рамках которых значения показателей функциональной активности микробиоты остаются постоянными.

Впервые для детей в возрасте от 4 месяцев до 14 лет определены референсные значения структурного индекса и индекса изокислот. Для структурного индекса нормальными являются значения от 0,389 единиц и выше. Для индекса изокислот нормальными являются значения от 1,311 единиц и ниже.

Впервые составлены и охарактеризованы четыре математические модели оценки дисбиотических изменений микробиоценоза ротоглотки детей:

1) математическая модель «Дисбиоз» для определения нарушений микробиоценоза ротоглотки, характеризующихся высокой бактериальной колонизацией, которая имеет 95,12% прогностической точности при 100% специфичности и 95,65% чувствительности (Патент на изобретение РФ 2741709 С1 от 28.01.2021);

2) математическая модель «Вирус» для определения нарушений микробиоценоза ротоглотки, характеризующихся присутствием респираторных вирусов, которая имеет 81,40% прогностической точности при 89,47% специфичности и 75,00% чувствительности (Патент на изобретение РФ 2741508 С1 от 26.01.2021);

3) математическая модель «ЧБД», позволяющая определить принадлежность ребенка к группе часто болеющих в остром периоде заболевания, которая имеет 83,72% прогностической точности, при 82,35% специфичности и 88,89% чувствительности (Патент на изобретение РФ 2742756 С1 от 10.02.2021);

4) математическая модель «ЧБД+», позволяющая определить принадлежность ребенка к группе часто болеющих в состоянии клинической ремиссии, которая имеет 76,68% прогностической точности, при 77,14% специфичности и 72,22% чувствительности.

Предложена компьютерная программа «Дисбиоз-скрин» для использования в сфере практического здравоохранения, которая по функциональной активности микробиоценоза ротоглотки ребенка позволяет проводить предиктивную диагностику этиологии острого респираторного заболевания, а также определяет возможную принадлежность его к группе часто болеющих детей (Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ 2021610894 от 19.01.2021).

Теоретическая и практическая значимость исследования

Создана интегральная система критериев оценки функциональной активности микробиоценоза ротоглотки, которая основана на использовании многофакторного анализа взаимодействия макроорганизма и микробиоты ротоглотки. Микрофлора ротоглотки характеризует состояние здоровья человека. Технология оценки состояния здоровья человека с использованием метаболитов микрофлоры была обозначена термином микробиом-ассоциированная метаболомика.

Обоснована необходимость использования интегральной оценки состояния микробиоценоза ротоглотки при помощи критериев оценки функциональной активности микробиоценоза ротоглотки: структурный индекс и индекс изокислот.

Установленные референсные значения критериев функциональной активности микробиоценоза ротоглотки у детей в возрасте от 4 месяцев до 14 лет позволяют оценить структуру (структурный индекс) и протеолитическую активность микробного сообщества (индекс изокислот).

Для оценки функциональной активности микробиоценоза ротоглотки целесообразно использовать относительные концентрации короткоцепочечных жирных кислот для снижения дисперсии их значений, связанной с активностью секреции слюнных желез.

Показана возможность применения метода математического моделирования для интегральной оценки функциональной активности микробиоценоза ротоглотки. Созданные и охарактеризованные четыре математические модели позволяют с определенной прогностической точностью оценить: бактериальную обсемененности ротоглотки (модель «Дисбиоз»), присутствие респираторного вируса в микробиоценозе ротоглотки (модель «Вирус»), принадлежность ребенка к группе часто болеющих в остром периоде инфекционного заболевания (модель «ЧБД») и в состоянии клинической ремиссии (модель «ЧБД+»).

Для расчета степени изменений функциональной активности микробиоценоза ротоглотки бактериальной и/или вирусной этиологии используется понятие коэффициента уникальности, который является количественной характеристикой дисбиотических нарушений.

Разработанная компьютерная программа «Дисбиоз-скрин» обосновывает возможность применения метода математического моделирования для решения практических задач: предиктивной диагностики этиологии острых респираторных заболеваний детей, а также коррекции дисбиотических нарушений микробиоценоза ротоглотки детей, в том числе в период формирования организованных коллективов (дошкольные, школьные, санаторные, реабилитационные и другие).

Результаты диссертации внедрены в работу клинко-диагностического центра ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (акт внедрения от 25.02.2021г.), в работу Общества с ограниченной ответственностью «Центр семейного здоровья» (акт внедрения от 18.03.2021г.), в работу Закрытого акционерного общества «ЭКОлаб» (акт внедрения от 12.11.2021г.).

Методология и методы исследования

Методология настоящего исследования основана на современных научно обоснованных принципах изучения функциональной активности микробиоценоза ротоглотки у людей (концентрации летучих жирных кислот в слюне) и спланирована в соответствии с поставленной целью и задачами. В качестве теоретического обоснования исследования использовали данные научной литературы. В работе использованы бактериологические, молекулярно-генетические, биохимические, аналитические и статистические методы исследований.

Все исследования были одобрены Комитетом по биомедицинской этике ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (протокол № 37 от 05.12.2019 года).

Работа выполнена в рамках НИР ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора «Эпидемиологические и клинические особенности некоторых инфекций, в том числе вирусной этиологии, в аспекте их связи с иммунопатологическими состояниями и дисбиотическими изменениями в организме» (Рег. № АААА-А16-116021550325-9 от 15.02.2016г.) и «Персонализация диагностики заболеваний респираторного тракта на основе индикации молекулярных маркеров в биосубстратах современными омикс-технологиями» (№ 121021100110-0 от 11.02.2021г.).

Объекты исследования

В соответствии с целью и задачами работы, было проведено комплексное биохимическое, бактериологическое и молекулярно-генетическое исследование нативного материала (слюна, мазки из ротоглотки, мазки из зева и носа) людей разных возрастных групп (от 1 месяца до 85 лет).

Изучены результаты анализов: 683 пациентов, в возрасте от 1 месяца до 85 лет (из них дети от 4 месяцев до 14 лет – 151 человек), которые обратились для сдачи анализа слюны на комплексное исследование в консультативно-диагностический центр при ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора в 2011-2018гг. Гендерные различия не учитывали. Результаты исследования изложены в главах «Оценка функциональной активности микробиоценоза ротоглотки у людей в разных возрастных группах», «Определение референсных значений концентраций короткоцепочечных жирных кислот в слюне у детей в возрасте от 4

месяцев до 14 лет» и «Модель диагностики микробиологических нарушений микробиоценоза ротоглотки у детей»; 47 детей в возрасте от 7 до 14 лет с острыми респираторными заболеваниями, которые находились под наблюдением врачей ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского» и проходили стационарное лечение в инфекционном отделении с диагнозами острый бронхит и острая внебольничная пневмония. Гендерные различия не учитывали. Результаты исследования изложены в главах «Модель диагностики вирусной респираторной инфекции у детей», «Модель выявления часто болеющих детей в острый период заболевания», «Характеристика функционального состояния микробиоценоза ротоглотки при остром бронхите и острой внебольничной пневмонии у детей» и «Характеристика функционального состояния микробиоценоза ротоглотки у часто болеющих детей»; 193 детей, которые находились в детском санатории «Поляны» Управления делами Президента Российской Федерации под наблюдением врача организации. Дети были в возрасте от 7 до 14 лет и не имели острых респираторных заболеваний на момент взятия у них материала на анализ. Гендерные различия не учитывали. Результаты исследования изложены в главе «Модель выявления часто болеющих детей, находящихся в состоянии клинической ремиссии».

Бактериологические методы исследования

Для бактериологического анализа мазков из ротоглотки людей использовали метод посева на питательные среды: агар Эндо (ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, Россия), желточно-солевой агар (основа - колумбийский агар, «Лабораториос КОНДА, С.А.», Испания), кровяной агар (основа – ГРМ-агар (ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, Россия) с добавлением 5% крови крупного рогатого скота), кандида-агар (ХайМедиа Лабораториз ПВТ. лтд, Индия), среда Уриселект («Био-Рад Лабораториес, САС.», Франция), агар трехсахарный с железом (основа – колумбийский агар, «Лабораториос КОНДА, С.А.», Испания), агар Симмонса с цитратом (ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, Россия), полужидкий агар (основа - колумбийский агар, «Лабораториос КОНДА, С.А.», Испания), сахара глюкоза, лактоза, рамноза, сорбит, малонат натрия, кларк (ХайМедиа Лабораториз ПВТ. лтд, Индия), среда МРС (бульон) («Лабораториос КОНДА, С.А.», Испания), среда Блаурокк (ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, Россия). Идентификацию микроорганизмов проводили на основании изучения культурально-морфологических, тинкториальных и биохимических свойств (Приказ МЗ СССР №535 от 22.04.1985).

Молекулярно-генетические методы исследования

Экстракцию ДНК/РНК возбудителей респираторных заболеваний из мазков из зева и носа детей, больных острым бронхитом и острой внебольничной пневмонией, проводили согласно инструкции производителя с использованием комплекта реагентов «РИБО-сорб» (ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Последующий анализ выделенной ДНК/РНК вирусов проводили методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени продуктов амплификации (ПЦР-РВ) с использованием наборов реагентов (ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией по их применению: «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL» (РНК - респираторносинцитиального вируса (*human Respiratory Syncytial virus - hRSv*), метапневмовируса (*human Metapneumovirus-hMpv*), вирусов парагриппа 1, 2, 3 и 4 типов (*human Parainfluenza virus-1-4-hPiv*), коронавирусов (*human Coronavirus - hCov*), риновирусов (*human Rhinovirus - hRv*); ДНК - аденовирусов групп В, С и Е (*human Adenovirus B,C,E- hAdv*) и бокавируса (*human Bocavirus - hBov*)); «АмплиСенс® Influenza virus A/B-FL» (РНК вирусов гриппа А (*Influenza virus A*) и гриппа В (*Influenza virus B*)); «Ам-

плиПрайм® HSV / CMV» (вируса простого герпеса (HSV) и цитомегаловируса (CMV)); "АмплиСенс EBV-скрин/монитор-FL" (ДНК вируса Эпштейна-Барр (EBV)). Амплификацию осуществляли с помощью прибора Rotor-Gene Q 5 plex HRM (QIAGEN GmbH, Германия). Анализ и интерпретацию результатов проводили с помощью программного обеспечения прибора Rotor-Gene Q 5 plex HRM (QIAGEN GmbH, Германия).

Биохимические методы исследования

Концентрации короткоцепочечных жирных кислот в слюне определяли методом газожидкостной хроматографии подкисленной слюны. Хроматографию проводили на газовом хроматографе Кристалл 5000.2 (ЗАО СКБ "Хроматэк", г. Йошкар-Ола) методом прямого ввода подкисленной надосадочной жидкости слюны в испаритель хроматографа для разделения элементов смеси. Использовали капиллярную кварцевую металлизированную колонку с неподвижной фазой FFAP, состоящую из полиэтиленгликоля модифицированного нитротерифталатом. Диаметр колонки 0,3 мм, длина 30 метров. Газ-носитель – химически чистый азот. Детектор - пламенно-ионизационный. Режим - изотерма 150°C. Расчет концентраций проводили по методу внутреннего стандарта (α -диметилмасляная кислота). Идентификацию КЖК проводили по временам удержания пиков (Иконников Н.С. и др., 1999; Кондракова О.А. и др., 2001).

Статистические методы исследования

В настоящей работе использовали методы простой описательной статистики, а также математическое моделирование (Боровиков В.П. и др., 1997; Зайцев В.М. и др., 2006; Трухачева Н.В., 2013). Выборки порядковых и количественных данных характеризовали, используя значения среднего арифметического и стандартного отклонения при уровне 95% для доверительного интервала, или медианой с интерквартильным разбросом. Соответствие выборок нормальному распределению проводили по критерию Шапиро-Уилка, в зависимости от значения которого принималось решение о выборе между параметрическими и непараметрическими методами сравнения средних. Для сравнения несвязанных выборок использовали U-критерий Манна-Уитни, для связанных выборок – W-критерий Уилкоксона. Сравнение качественных переменных проводили по частотам встречаемости с оценкой статистической значимости по критерию согласия Пирсона (критерий Хи-квадрат). Связанность параметров определяли корреляционным анализом по значениям коэффициентов корреляции Пирсона. Для всех статистических тестов устанавливали пороговый уровень альфа-ошибки $p < 0,05$. Определение пороговых значений между выборками и качество бинарной классификации проводили с использованием бинарного классификатора - ROC-анализа. Выявление специфических соотношений концентраций короткоцепочечных кислот в слюне определяли линейным дискриминантным анализом. По результатам математического моделирования были получены решающие правила классификации объектов. Рассчитывали качественные характеристики моделей (прогностическая точность, специфичность, чувствительность), статистическую значимость разделения групп, дискриминантную функцию, координаты центроидов. Количественную оценку специфических соотношений компонентов концентраций короткоцепочечных жирных кислот рассчитывали по соотношению расстояний от центроидов (коэффициент уникальности). Статистический анализ полученных данных проводили с использованием программных пакетов Statistica 8.0 и MS Office Excel 2010.

Личное участие автора в получении результатов

Автор участвовал в организации всех этапов исследования: в разработке методологии проведения научного исследования (бактериологические, молекулярно-генетические, биохимические исследования); в разработке на основе статистической обработки результатов и математического моделирования системы интегральной оценки микробиоценоза ротоглотки детей; в обосновании выводов; в разработке практических рекомендаций и перспектив дальнейшего исследования.

Бактериологические и биохимические исследования автор выполнял совместно с сотрудниками лаборатории диагностики и профилактики инфекционных заболеваний ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора - М.П. Гусаровой, Е.А. Затеваловой, Н.К. Кошкиной.

Молекулярно-генетические исследования автор выполнял совместно с руководителем лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, д.б.н., доцентом Е.А. Воропаевой.

Формирование групп пациентов для создания моделей диагностики вирусной респираторной инфекции у детей и выявления часто болеющих детей в острый период заболевания, а также постановка диагнозов острый бронхит, острая внебольничная пневмония пациентам проводилась лечащим врачом детского инфекционного отделения ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского» Медведевой Е.А., под руководством профессора кафедры педиатрии факультета усовершенствования врачей, д.м.н. Е.Р. Мескиной. Формирование групп пациентов для создания модели для выявления часто болеющих детей, находящихся в состоянии клинической ремиссии, проводилось совместно с врачами педиатрами детского санатория «Поляны» Управления делами Президента Российской Федерации.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Функциональное состояние микробиоценоза ротоглотки оценивается по диагностическим критериям и референсным значениям концентраций короткоцепочечных жирных кислот в слюне.

2. Метод микробиом-ассоциированной метаболомики с высокой прогностической точностью позволяет предположить этиологический фактор респираторного заболевания и принадлежность пациента к группе часто болеющих.

3. Возможности микробиом-ассоциированной метаболомики позволяют применить значения концентраций короткоцепочечных жирных кислот в слюне для интегральной оценки функционального состояния микробиоценоза ротоглотки.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность и обоснованность полученных результатов работы основаны на значительном объеме исследований (изучен биологический материал от 923 человек) с помощью современных бактериологических, молекулярно-генетических, биохимических методов исследований, с использованием программного обеспечения для проведения статистического анализа данных.

Диссертация апробирована на заседании секции Ученого Совета Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека «Эпидемиология, микробиология, клиника инфекционных болезней» 27 апреля 2021 года (Протокол № 3).

Основные положения диссертации доложены на: Всероссийской научно-практической конференции «Инновационные технологии в противоэпидемической защите населения». - Нижний Новгород, 2014; конференции с международным участием "Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности». - Санкт-Петербург, 2014; Нижний Новгород, 2018; XIX форуме «Национальные дни лабораторной медицины России – 2015». - Москва, 2015; 12-ой Международной научной гастроэнтерологической сессии НОГР «Санкт-Петербург – Гастросессия – 2015». - Санкт-Петербург, 2015; Ежегодной Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Контроль и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи» (ИСМП-2015, ИСМП-2016). – Москва, 2015; Москва, 2016; VIII Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием. -

Москва, 2016; Научно-практической конференции «Актуальные вопросы инфекционной патологии: природно-очаговые и инфекционные болезни». - Пермь, 2016.; Международном Славяно-Балтийском научном форуме «Санкт-Петербург – Гастро». – Санкт-Петербург, 2016; Санкт-Петербург, 2018; Российско-Китайской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии XIX Кашкинские чтения. – Санкт-Петербург, 2016; Fourth International Scientific Conference «Bacteriophages: Theoretical and Practical Aspects of Their Application in Medicine, Veterinary and Food - to the 70th Anniversary of professor V.A. Aleshkin», September 24-26, 2018, Nizhni Novgorod, Russia; VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Электрогорск, 2019; III и IV Научно-практической конференции с международным участием «Инфекции, передаваемые воздушно-капельным путем: от самых известных до почти забытых - актуальные вопросы диагностики, лечения и профилактики». - Москва, 2022.

По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 3 статьи - в рецензируемых изданиях, 1 статья – в другом издании, 1 тезисы – в рецензируемом издании, 2 тезисов – в материалах конференций, получено 3 патента на изобретения РФ, 1 свидетельство о регистрации программы для ЭВМ.

Объем и структура диссертации

Материалы диссертации изложены на 147 страницах машинописного текста, иллюстрированы 26 таблицами, 16 рисунками. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка использованной литературы, включающего 178 источников, из которых 96 – отечественных, 82 – зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Оценка функциональной активности микробиоценоза ротоглотки у людей в разных возрастных группах

На первом этапе в работу по исследованию функциональной активности микробиоты ротоглотки отобраны образцы слюны тех пациентов, результаты бактериологических анализов мазков из ротоглотки которых соответствовали нормоценозу: представители нормофлоры ротоглотки (*Streptococcus a-hem+*, *Streptococcus γ-hem+*, *Neisseria spp.*) - присутствовали в количестве не более 6 lg КОЕ/г; представители условно-патогенной микрофлоры (*Streptococcus β-hem+*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas spp.*, *Candida spp.*, *E. coli*, *Micrococcus spp.* и др.) – в мазках не определялись.

Были установлены три возрастные группы пациентов без заболеваний респираторного тракта, значения показателей функциональной активности микробиоты ротоглотки которых не имеют монотонного роста или снижения на всем исследуемом интервале: до 4 месяцев жизни, от 4 месяцев до 14 лет и от 14 лет и старше. Последний возрастной интервал (старше 14 лет) характеризуется стабильной структурой функциональной активности микробиоты ротоглотки пациентов. Однако суммарная концентрация короткоцепочечных жирных кислот (КЖК) и концентрация уксусной кислоты в слюне тех же пациентов имеют высокий разброс значений, что не позволяет дополнительно разделить значения их концентраций по возрастным интервалам пациентов. В соответствии с этими же данными статистически значимые ($p < 0,05$) изменения показателей функциональной активности микробиоты ротоглотки в 4 месяца и 14 лет связаны с изменением ее состава. Изменения состава микробиоценоза в 4 месяца связывают с прорезыванием зубов и появлением новых экологических ниш, в которых размножается анаэробная микрофлора. Изменение состава микрофлоры в 14 лет связывают с завершением смены зубов, возрастными сдвигами гормонального фона и увеличением контактов в подростковом возрасте (Zaura E. et. al., 2009; Xian P. et. al., 2018).

Установлено, что структурный индекс и индекс изокилот являются наиболее чувствительными к изменениям структуры микробиоты ротоглотки (Таблица 1).

Таблица 1 – Расчетные индексы и соотношения КЖК в слюне у пациентов различных возрастных групп

Возраст	Количество исследований	Среднее значение (интерквартильный разброс)
Структурный индекс, ед.		
0 – 13 лет	392	0,25 (0,18 - 0,35)
14 - 85 лет	291	0,27 (0,19 - 0,38)
Индекс изокилот, ед.		
0 – 3 мес	82	1,89 (1,25 - 2,42)
4 мес - 13 лет.	310	1,04 (0,64 - 1,85)
14 - 85 лет	291	0,74 (0,40 - 1,03)
Доля компонента КЖК в сумме уксусной:пропионовой:масляной кислот, %		
Уксусная кислота		
0 - 13 лет	392	86,59 (80,92 - 89,58)
14 - 85 лет	291	80,3 (75,37 - 85,73)
Пропионовая кислота		
0 – 3 мес	82	12,46 (9,66 - 17,6)
4 мес - 13 лет	310	11,25 (7,93 - 16,16)
14 - 85 лет	291	16,09 (11,81 - 19,81)
Масляная кислота		
0 – 3 мес	82	1,4 (0,62 - 2,24)
4 мес - 13 лет	310	1,72 (1,1 - 2,83)
14 - 85 лет	291	2,73 (1,54 - 4,9)

Примечание: выборки соседних возрастных подгрупп для каждого показателя статистически значимо отличались друг от друга, рассчитанно по U-критерию Манна-Уитн, $p < 0,05$

Результаты исследований показали (Таблица 1), что:

- 1) функциональная активность индигенной микрофлоры ротоглотки (структурный индекс) увеличивается единожды в 14 лет в 1,1 раза;
- 2) снижение протеолитической активности микробиоценоза ротоглотки с возрастом (индекс изокилот) происходит в 1,7 раза — в 4 месяца, и еще в 2,4 раза — в 14 лет;
- 3) доля уксусной кислоты в слюне изменяется только в двух интервалах: от 0 до 14 лет и старше 14 лет. У людей старше 14 лет она снижается в 1,1 раза, что указывает на увеличение доли анаэробной микрофлоры в микробиоценозе ротоглотки;
- 4) доля пропионовой кислоты в слюне изменяется в трех интервалах: от 0 до 4 месяцев; от 4 месяцев до 14 лет; от 14 лет и старше. Она незначительно снижается в 4 месяца (в 1,1 раза) и увеличивается в 1,5 раза в 14 лет;
- 5) доля масляной кислоты в слюне также изменяется в трех интервалах: от 0 до 4 месяцев; от 4 месяцев до 14 лет; от 14 лет и старше. Она увеличивается в 4 месяца в 1,2 раза, а в 14 лет - в 1,6 раза.

В установленных трех возрастных группах, в рамках которых показатели функциональной активности микробиоценоза ротоглотки остаются неизменными, проанализированы результаты бактериологических анализов мазков из ротоглотки (Таблица 2).

Результаты исследований, представленные в таблице 2, показали, что в установленных трех возрастных группах, которые были определены в результате исследования функциональной активности микробиоценоза ротоглотки (до 4 месяцев, 4 месяца - 14 лет, 14 лет и старше), микробиологический состав микробиоценоза ротоглотки имеет структуру, отвечающую физиологическим особенностям этого биотопа в соответствующем возрасте.

Таблица 2 - Бактериологическое исследование мазков из ротоглотки пациентов трех возрастных групп

Микроорганизмы	Частота встречаемости (%) и интенсивность обсемененности (lg КОЕ/г) в возрастных группах		
	до 4 месяцев	4 мес. – 14 лет	старше 14 лет
<i>Streptococcus α-hem+</i>	21 (4)	83 (5,5)*	99 (6)
<i>Streptococcus γ-hem+</i>	5 (4,5)	15 (4,5)*	22 (5)
<i>Neisseria spp.</i>	9 (4,5)	65 (5)*	92 (5,5)**
<i>Lactobacillus spp.</i>	92 (6)	78 (5,5)	56 (5)
<i>Bifidobacterium spp.</i>	91 (6)	80 (5)	68 (4,5)

Примечание: * - отмечено статистически значимое отличие между группой «до 4 месяцев» и группой «4 месяца – 14 лет», рассчитанно по критерию согласия Пирсона (Chi-квадрат); ** - отмечено статистически значимое отличие между группой «4 месяца – 14 лет» и группой «старше 14 лет», рассчитанно по критерию согласия Пирсона (Chi-квадрат), $p < 0,05$

Полученные результаты позволили при проведении дальнейших исследований, связанных с изучением функциональной активности микробиоценоза ротоглотки, опираться на относительные концентрации КЖК, индекс изокислот и структурный индекс, а также использовать аппарат математического моделирования и многомерной статистики в 3 возрастных интервалах: 0 – 4 месяца; 4 месяцев — 14 лет; с 14 лет и старше.

Определение референсных значений короткоцепочечных жирных кислот в слюне у детей в возрасте от 4 месяцев до 14 лет

Определены границы значений для показателей функциональной активности микрофлоры ротоглотки (КЖК, структурный индекс, индекс изокислот) у детей в возрасте от 4 месяцев до 14 лет, при состоянии микробиоценоза ротоглотки в норме и при выявленных дисбиотических нарушениях. Эти значения определялись методом математического моделирования (ROC-анализ) и оценивались как референсные.

Для проведения ROC-анализа использовались результаты биохимических анализов слюны детей в возрасте от 4 месяцев до 14 лет. В основную группу вошли дети, у которых в бактериологическом анализе мазка из ротоглотки условно-патогенная микрофлора определялась в количестве более 6 lg КОЕ/г. В группу сравнения вошли дети в бактериологическом анализе мазка которых интенсивность обсемененности ротоглотки условно-патогенной микрофлорой не превышала 6 lg КОЕ/г (Таблица 3) (Алешкин В.А. и др., 2015).

Таблица 3 - Бактериологическое исследование мазков из ротоглотки пациентов

Микроорганизмы	Основная группа, частота встречаемости, %; (интенсивность обсемененности, lg КОЕ/г)	Группа сравнения, частота встречаемости, %; (интенсивность обсемененности, lg КОЕ/г)
<i>Streptococcus α-hem+</i>	39,7 (7)	33,3 (5,5)
<i>Streptococcus β-hem+</i>	5,8 (5)*	0
<i>Streptococcus γ-hem+</i>	2,5 (5)*	16,7 (5)
<i>Staphylococcus spp.</i>	4,1 (5)*	90 (5)
<i>Staphylococcus aureus</i>	86,8 (6)*	0
<i>Staphylococcus hem+</i>	2,5 (5)*	0
<i>Neisseria spp.</i>	14 (4)	23,3 (5)
<i>Klebsiella spp.</i>	15 (4,5)	10 (5)
<i>Enterobacter spp.</i>	6,8 (4)*	0,7 (5)
<i>Candida spp.</i>	20,7 (4)*	10 (4)
<i>E. coli</i>	0,8 (4)*	0

Продолжение таблицы 3

Микроорганизмы	Основная группа, частота встречаемости, %; (интенсивность обсемененности, lg КОЕ/г)	Группа сравнения, частота встречаемости, %; (интенсивность обсемененности, lg КОЕ/г)
<i>Acinetobacter spp.</i>	0,8 (5)*	0

Примечание: * - отмечено статистически значимое отличие между группами, рассчитанно по критерию согласия Пирсона (Chi-квадрат), $p < 0,05$

В основной группе (Таблица 3) выше разнообразие микроорганизмов и их общее микробное число. Статистически значимо ($p < 0,05$) чаще встречаются *Streptococcus β hem+*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hem+*, *Enterobacter spp.*, *Candida spp.*, *E. coli* и *Acinetobacter spp.* Интенсивность обсемененности в основной группе для вышеперечисленных организмов или выше или равна интенсивности обсемененности этими микроорганизмами в группе сравнения. В группе сравнения чаще высеиваются представители нормальной микрофлоры ротоглотки: *Streptococcus γ-hem+*, *Neisseria spp.*, *Staphylococcus spp.*

В результате расчетов установлено, что структурный индекс и индекс изокислот имеют очень высокие показатели прогностической значимости (AUC 0,966 и 0,812 соответственно) (Рисунок 1а).

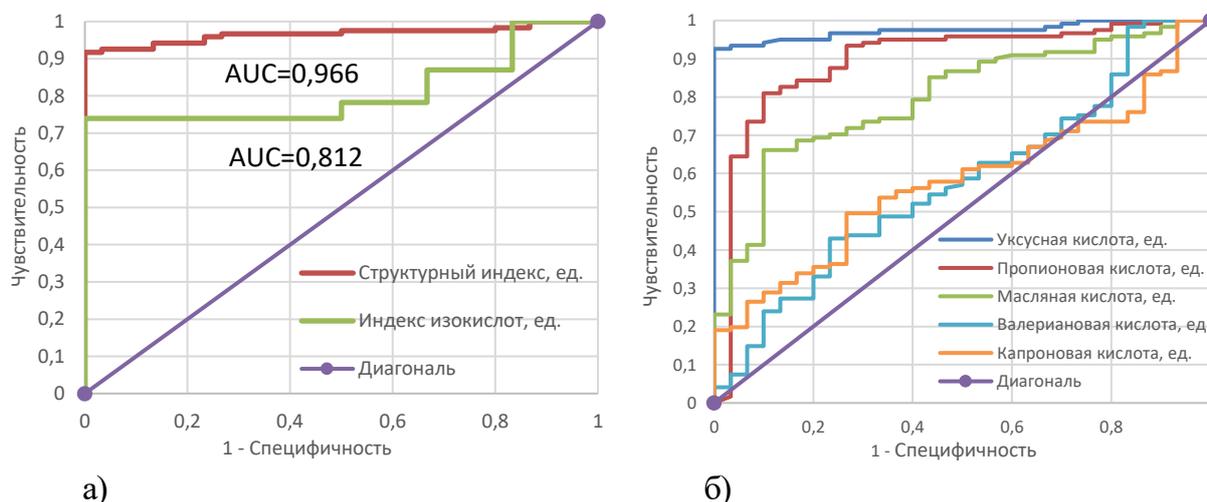


Рисунок 1 – ROC-кривые для интегральных критериев функциональной активности микробиоценоза ротоглотки (а) и концентраций КЖК в слюне (б)

Для структурного индекса референсное значение составило - не менее 0,389 ед., а для индекса изокислот - не более 1,311 ед.

Относительные концентрации КЖК характеризуются значениями AUC выше 0,5 (Рисунок 1б), что указывает на их положительную прогностическую значимость, поэтому для каждой из них были определены референсные значения: уксусной – не более 0,759 ед.; пропионовой – не менее 0,239 ед.; изомаляной – не менее 0,022 ед.; масляной не менее 0,028 ед.; изовалериановой – не менее 0,003 ед.; валериановой – не менее 0,017 ед.; изокапроновой – не менее 0,001 ед.; капроновой – не менее 0,001 ед.

Создание математической диагностико-прогностической модели дисбиотических изменений ротоглотки у детей

Средствами математического моделирования были построены и обоснованы четыре модели оценки дисбиотических изменений:

- 1) модель «Дисбиоз» для определения нарушений микробиоценоза ротоглотки, характеризующихся высокой бактериальной колонизацией;
- 2) модель «Вирус» для определения нарушений микробиоценоза ротоглотки, характеризующихся присутствием респираторных вирусов;

3) модель «ЧБД», позволяющая определить принадлежность ребенка к группе часто болеющих детей в остром периоде заболевания;

4) модель «ЧБД+», позволяющая определить принадлежность ребенка к группе часто болеющих детей в состоянии клинической ремиссии.

Для каждой разработанной модели были определены показатели их прогностической точности, специфичности и чувствительности.

При построении моделей использовали относительные концентрации КЖК (концентрации, приведенные к сумме всех определяемых кислот) в слюне детей в возрасте от 4 месяцев до 14 лет, чтобы избежать влияния количества ротовой жидкости на значения определяемых концентраций. Показано, что в возрастной группе от 4 месяцев до 14 лет концентрации КЖК в слюне и, соответственно, их расчетные индексы остаются постоянными, именно поэтому в линейном дискриминантном анализе, анализе сопряженности с прямой пошаговой процедурой включения показателей концентраций КЖК в слюне, использовались концентрации КЖК в слюне от пациентов, ограниченных этим возрастным интервалом (Зайцев В.М. и др., 2006).

Модель диагностики микробиологических нарушений микробиоценоза ротоглотки у детей (модель «Дисбиоз»)

При разработке математической модели «Дисбиоз» сравнивали относительные концентрации КЖК в слюне детей в возрасте от 4 месяцев до 14 лет из двух групп. В основную группу вошли дети с интенсивностью обсемененности ротоглотки условно-патогенной микрофлорой выше 6 lg КОЕ/г, а в группу сравнения – ниже 6 lg КОЕ/г (Таблица 4).

Таблица 4 - Бактериологическое исследование мазков из ротоглотки пациентов

Микроорганизмы	Основная группа, частота встречаемости, %; (интенсивность обсемененности, lg КОЕ/г)	Группа сравнения, частота встречаемости, %; (интенсивность обсемененности, lg КОЕ/г)
<i>Streptococcus α-hem+</i>	39,7 (7)	33,3 (5,5)
<i>Streptococcus β-hem+</i>	5,8 (5)*	0
<i>Streptococcus γ-hem+</i>	2,5 (5)*	16,7 (5)
<i>Staphylococcus spp.</i>	4,1 (5)*	90 (5)
<i>Staphylococcus aureus</i>	86,8 (6)*	0
<i>Staphylococcus hem+</i>	2,5 (5)*	0
<i>Neisseria spp.</i>	14 (4)	23,3 (5)
<i>Klebsiella spp.</i>	15 (4,5)	10 (5)
<i>Enterobacter spp.</i>	6,8 (4)*	0,7 (5)
<i>Candida spp.</i>	20,7 (4)*	10 (4)
<i>E. coli</i>	0,8 (4)*	0
<i>Acinetobacter spp.</i>	0,8 (5)*	0

Примечание: * - отмечено статистически значимое отличие между группами, рассчитанно по критерию согласия Пирсона (Chi-квадрат), $p < 0,05$

В основной группе (Таблица 4) статистически значимо ($p < 0,05$) чаще встречались *Enterobacter spp.* и *Candida spp.* Также в основной группе высевались другие представители условно-патогенной микрофлоры, которые не встречались в мазках из ротоглотки пациентов группы сравнения: *Streptococcus β-hem+*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hem+*, *E. coli* и *Acinetobacter spp.*

В математическую модель «Дисбиоз» методом пошагового исключения компонентов и анализом сопряженности были включены показатели относительных концентраций уксусной (C2), пропионовой (C3), изомасляной (iC4), масляной (C4), капроновой (C6) кислот в слюне. В соответствии с коэффициентами уравнений, рассчитанными в программе Statistica

8.0, составлены дискриминантная функция, классификационные уравнения и рассчитаны расстояния Махаланобиса для всех пациентов, участвующих в исследовании. Математическая модель «Дисбиоз» имеет 95,12% прогностической точности при 100% специфичности и 95,65% чувствительности, что является высокими прогностическими показателями.

Дискриминантная функция (D), определяющая координаты объекта в дискриминантном пространстве:

$$D = -65,846 * C_2 - 51,084 * C_3 - 68,381 * iC_4 - 55,087 * C_4 - 227,577 * C_6 + 61,894$$

Классификационные уравнения (функция, значение которой будет максимально, указывает на принадлежность объекта к соответствующей группе):

$$F_{ог} = 12210,91 * C_2 + 11890,28 * C_3 + 13156,14 * iC_4 + 12226,24 * C_4 + 42514,51 * C_6 - 6025,33$$

$$F_{гс} = 12015,23 * C_2 + 11738,47 * C_3 + 12952,92 * iC_4 + 12062,53 * C_4 + 41838,19 * C_6 - 5846,01, \text{ где}$$

$F_{ог}$ – классификационная функция, при максимальном значении которой у объекта прогнозируются микробиологические нарушения;

$F_{гс}$ – классификационная функция, при максимальном значении которой у объекта не прогнозируются микробиологические нарушения.

Модель диагностики вирусной респираторной инфекции у детей (модель «Вирус»)

При разработке математической модели «Вирус» сравнивали относительные концентрации КЖК в слюне детей из двух групп. В основную группу вошли дети в возрасте от 7 до 14 лет, находящиеся на стационарном лечении с диагнозом острый бронхит или острая внебольничная пневмония. Вирусная этиология заболевания подтверждалась молекулярно-генетическим методом (метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, ПЦР-РВ) в мазках из зева и носа (Таблица 5). В группу сравнения вошли дети, в мазках которых ДНК/РНК вирусов не определялись.

Таблица 5 - Частота встречаемости вирусов в мазках из носа и зева у детей в основной группе

ДНК/РНК штаммов респираторных вирусов	Частота встречаемости, %	ДНК/РНК штаммов респираторных вирусов	Частота встречаемости, %
<i>H. rhinovirus</i>	33,3	<i>Influenza virus B</i>	4,8
<i>H. metapneumovirus</i>	23,8	<i>Epstein-Barr virus</i>	4,8
<i>H. respiratory syncytial virus</i>	19,0	<i>H. coronavirus</i>	0,0
<i>H. adenovirus</i>	9,5	<i>H. bocavirus</i>	0,0
<i>Influenza virus A</i>	9,5	<i>Herpes simplex virus 1/2</i>	0,0
<i>H. parainfluenza virus 1/3, 2/4</i>	4,8	<i>Cytomegalovirus</i>	0,0

Литературные данные свидетельствуют о том, что присутствие респираторного вируса влияет на функциональную активность микробиоценоза ротоглотки, носа и прочих локусов респираторного тракта. Вирусы полагаются на метаболическую сеть своих хозяев, в нашем случае на метаболическую сеть микробно-тканевого комплекса ротоглотки в целях обеспечения собственной репликации (Munger J. et. al., 2008).

В математическую модель «Вирус» методом пошагового исключения компонентов и анализом сопряженности были включены показатели относительных концентраций изокапроновой (iC_6) и капроновой (C_6) кислот в слюне. Получены дискриминантная функция, классификационные уравнения и рассчитаны расстояния Махаланобиса для всех пациентов, участвующих в исследовании. Математическая модель «Вирус» имеет 81,40% прогностической точности при 89,47% специфичности и 75,00% чувствительности.

Дискриминантная функция (D), определяющая координаты объекта в дискриминантном пространстве:

$$D = -111,898,087 * iC_6 + 319,837 * C_6 - 0,116.$$

Классификационные уравнения (функция, значение которой будет максимально, указывает на принадлежность объекта к соответствующей группе):

$$F_{ог} = -185,459 * iC_6 + 883,891 * C_6 - 2,241$$

$$F_{гс} = -25,8862 * iC_6 + 427,7867 * C_6 - 1,8652, \text{ где}$$

$F_{ог}$ – классификационная функция, при максимальном значении которой у объекта прогнозируются наличие респираторного вируса;

$F_{гс}$ - классификационная функция, при максимальном значении которой у объекта прогнозируются отсутствие респираторного вируса.

Модель выявления часто болеющих детей в острый период заболевания (модель «ЧБД»)

При разработке математической модели «ЧБД» сравнивали относительные концентрации КЖК в слюне детей в возрасте от 7 до 14 лет, которые в соответствии с критериями В.Ю. Альбицкого и А.А. Баранова были поделены на две группы (основная группа - часто болеющие дети, группа сравнения - эпизодически болеющие дети) (Альбицкий В.Ю. и др., 1986). Эти дети находились на стационарном лечении с диагнозами острый бронхит или острая внебольничная пневмония.

В исследуемых группах пациентов проанализированы результаты бактериологических анализов мазков из ротоглотки (Таблица 6).

Таблица 6 - Бактериологическое исследование мазков из ротоглотки пациентов в острый период заболевания

Микроорганизмы	Основная группа, частота встречаемости, %; (интенсивность обсемененности, lg КОЕ/г)	Группа сравнения, частота встречаемости, %; (интенсивность обсемененности, lg КОЕ/г)
<i>Streptococcus α-hem+</i>	100 (5)	100 (6)
<i>Streptococcus β-hem+</i>	26 (4,5)*	2,1 (4)
<i>Streptococcus γ-hem+</i>	76 (4,5)	82 (5)
<i>Staphylococcus spp.</i>	79 (6)*	35 (5,5)
<i>Staphylococcus aureus</i>	15,6 (4)	6,7 (5)
<i>Neisseria spp.</i>	86,7 (6)	93,8 (6,5)
<i>Klebsiella spp.</i>	13,3 (4,5)	6,3 (5)
<i>Enterobacter spp.</i>	6,3 (4)*	0
<i>Candida spp.</i>	33,3 (4)	28,1 (4)
<i>E. coli</i>	2,3 (4)	0
<i>Pseudomonas spp.</i>	37 (4,5)*	13,3 (4)

Примечание: * - отмечено статистически значимое отличие между группами, рассчитанно по критерию согласия Пирсона (Chi-квадрат), $p < 0,05$

У детей из основной группы (Таблица 6) в бактериологических анализах мазков из ротоглотки статистически значимо ($p < 0,05$) чаще встречались *Streptococcus β-hem+*, *Staphylococcus spp.*, *Pseudomonas spp.* в титре 4,5-6 lg КОЕ/г. Также в основной группе высевались другие представители условно-патогенной микрофлоры, которые не встречались в мазках из ротоглотки пациентов группы сравнения: *Enterobacter spp.*, *E. coli* в титре 4 lg КОЕ/г. Результаты бактериологического исследования соответствуют представлениям о состоянии микробиоценоза ротоглотки у часто болеющих детей в острый период заболевания (Мамаева М.А., 2011; Медведева Е.А., 2015).

В математическую модель «ЧБД» методом пошагового исключения компонентов и анализом сопряженности были включены показатели относительных концентраций уксусной (C2), пропионовой (C3), изовалериановой (iC5) и валериановой (C5) кислот в слюне детей. Получены дискриминантная функция, классификационные уравнения и рассчитаны расстоя-

ния Махалонобиса для всех пациентов, участвующих в исследовании. Математическая модель «ЧБД» имеет 83,72% прогностической точности, при 82,35% специфичности и 88,89% чувствительности.

Дискриминантная функция (D), определяющая координаты объекта в дискриминантном пространстве:

$$D=28,618*C2+36,8458*C3+191,9914*iC562,0307*C5-30,4709.$$

Классификационные уравнения (функция, значение которой будет максимально, указывает на принадлежность объекта к соответствующей группе):

$$F_{ог} = 1368,494*C2+1538,684*C3+7103,235*iC5+2165,619*C5-683,304$$

$$F_{гс} = 1403,533*C2+1583,797*C3+7338,304*iC5+2241,567*C5-719,622, \text{ где}$$

$F_{ог}$ – классификационная функция, при максимальном значении которой объект относится к когорте часто болеющие дети;

$F_{гс}$ – классификационная функция, при максимальном значении которой объект не относится к когорте часто болеющие дети.

Модель выявления часто болеющих детей, находящихся в состоянии клинической ремиссии (модель «ЧБД+»)

При разработке математической модели «ЧБД+» сравнивали относительные концентрации КЖК в слюне детей в возрасте от 7 до 14 лет, находящихся в состоянии клинической ремиссии. Дети в соответствии с критериями В.Ю. Альбицкого и А.А. Баранова были поделены на две группы (основная группа - часто болеющие дети, группа сравнения - эпизодически болеющие дети) (Альбицкий В.Ю. и др., 1986).

В исследуемых группах пациентов проанализированы результаты бактериологических анализов мазков из ротоглотки (Таблица 7).

Таблица 7 - Бактериологическое исследование мазков из ротоглотки пациентов в состоянии ремиссии

Микроорганизмы	Основная группа, частота встречаемости, %; (интенсивность обсемененности, lg КОЕ/г)	Группа сравнения, частота встречаемости, %; (интенсивность обсемененности, lg КОЕ/г)
<i>Streptococcus α-hem+</i>	88 (5,5)	100 (6)
<i>Streptococcus β-hem+</i>	0,7 (4)	0
<i>Streptococcus γ-hem+</i>	53 (4)	69 (4,5)
<i>Staphylococcus spp.</i>	17 (4,5)*	4 (4,5)
<i>Staphylococcus aureus</i>	7,9 (4)*	0
<i>Neisseria spp.</i>	72 (6,5)	84 (6,5)
<i>Klebsiella spp.</i>	4,9 (4)*	0
<i>Candida spp.</i>	19 (4) *	3,4 (4)

Примечание: * - отмечено статистически значимое отличие между группами, рассчитанно по критерию согласия Пирсона (Chi-квадрат), $p < 0,05$

В основной группе (Таблица 7) статистически значимо ($p < 0,05$) чаще встречались *Staphylococcus spp.*, *Candida spp.* в титрах 4–4,5 lg КОЕ/г. Также в основной группе высевались другие представители условно-патогенной микрофлоры, которые не встречались в мазках из ротоглотки пациентов группы сравнения: *Streptococcus β-hem+*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella spp.* Интенсивность обсемененности этими микроорганизмами не составляла более 4 lg КОЕ/г. Результаты бактериологического исследования соответствуют представлениям о состоянии микробиоценоза ротоглотки у часто болеющих детей в период клинической ремиссии (Медведева Е.А., 2015).

В математическую модель «ЧБД+» методом пошагового исключения компонентов и анализом сопряженности были включены показатели относительных концентраций: изомас-

ляной (iC4), масляной (C4), изовалериановой (iC5) и капроновой (C6) кислот в слюне. Получены дискриминантная функция, классификационные уравнения и рассчитаны расстояния Махаланобиса для всех пациентов, участвующих в исследовании. Математическая модель «ЧБД+» имеет 76,68% прогностической точности, при 77,14% специфичности и 72,22% чувствительности, что является допустимыми прогностическими показателями.

Дискриминантная функция (D), определяющая координаты объекта в дискриминантном пространстве:

$$D=88,429*iC4+38,665*C4-119,395*iC5-320,504*C6-0,809.$$

Классификационные уравнения (функция, значение которой будет максимально, указывает на принадлежность объекта к соответствующей группе):

$$F_{ог} = 48,2003*iC4-5,8212*C4+49,1095*iC5+369,9298*C6-2,4024$$

$$F_{гс} = 129,961*iC4+299281*C4-61,2817*iC5+73,5953*C6-1,9865, \text{ где}$$

$F_{ог}$ – классификационная функция, при максимальном значении которой объект относится к когорте часто болеющие дети;

$F_{гс}$ – классификационная функция, при максимальном значении которой объект не относится к когорте часто болеющие дети.

Полученные классификационные уравнения четырех математических моделей позволяют оценить частоту встречаемости пациентов с дисбиозом ротоглотки бактериальной и вирусной этиологии, а также принадлежность к группе часто болеющих как в острый период, так и в состоянии клинической ремиссии. Кроме классификационных уравнений по соотношению расстояний Махаланобиса для каждого пациента можно рассчитать коэффициенты уникальности, которые являются количественной мерой изменений функциональной активности микробиоценоза ротоглотки, специфичной для каждого из четырех состояний, описанных математическими моделями.

Оценка особенностей микробиоценозов ротоглотки у детей, выявленных методом математического моделирования

На втором этапе исследования проводили интегральную оценку микробиоценоза ротоглотки у пациентов детского возраста от 7 до 14 лет с острым бронхитом и острой внебольничной пневмонией, а также в группах часто и эпизодически болеющих детей в острой фазе респираторного заболевания с использованием классических лабораторных методов исследования биоматериала и разработанных математических моделей для подтверждения прогностической ценности последних.

Характеристика функционального состояния микробиоценоза ротоглотки при остром бронхите и острой внебольничной пневмонии у детей

Для оценки функциональной активности микробиоценоза ротоглотки у пациентов, находящихся на стационарном лечении с диагнозами острый бронхит или острая внебольничная пневмония, проводили биохимический анализ слюны (метод газо-жидкостной хроматографии). Выявлено снижение структурного индекса ниже критического значения для детей из группы «Острый бронхит» в 95,8% случаев, для детей из группы «Острая пневмония» в 79,2% случаев, что может быть связано с большим подавлением функциональной активности индигенной микрофлоры ротоглотки у детей группы «Острый бронхит». У 100% детей из группы «Острый бронхит» в микробиоценозе ротоглотки была снижена доля масляной кислоты и у 70% - доля уксусной кислоты превышала критическое значение. Масляная кислота является энергосубстратом для эпителиоцитов. Ее дефицит приводит к нарушению проницаемости эпителия и снижению колонизационной резистентности микробиоценоза. Снижение концентрации масляной кислоты ниже критических значений может быть причиной подавления функциональной активности индигенной микрофлоры и снижения колонизационной резистентности микробиоценоза ротоглотки пациентов при остром бронхите в большей сте-

пени, чем при острой внебольничной пневмонии (De Steenhuijsen Piters W.A. et. al., 2016; Wu B.G. et. al., 2018).

При проведении бактериологических исследований мазков из ротоглотки выявлено, что микрофлора ротоглотки у большинства детей из групп «Острый бронхит» и «Острая пневмония» представлена микроорганизмами, типичными для данного биотопа (*Streptococcus spp. a-hem+*, *Neisseria spp.*) с интенсивностью бактериальной колонизации равной 6-7 lg КОЕ/г. Между тем было установлено снижение биоразнообразия микробиоценоза у пациентов в группе «Острый бронхит» с одновременным статистически значимым ($p < 0,05$) увеличением частот встречаемости штаммов условно-патогенных микроорганизмов (*Candida spp.* на 18%, *S.aureus* на 9%). В мазках из зева пациентов группы «Острая пневмония» были выделены штаммы *Enterobacter spp.*, *Pseudomonas spp.* в титрах 3 – 4,5 lg КОЕ/г, не являющиеся представителями типичной микрофлорой ротоглотки, что указывает на дисбиотические изменения микробиоты.

Методом молекулярно-генетической диагностики (полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, ПЦР-РВ) проведено сравнение частот встречаемости разных респираторных вирусов в мазках из носа и зева у детей из групп «Острый бронхит» и «Острая пневмония». Суммарная частота встречаемости респираторных вирусов в микробиоценозе ротоглотки была статистически значимо ($p < 0,05$) больше в группе пациентов «Острый бронхит» с преобладанием *H.rhinovirus* (частота встречаемости в выборке 22%). В микробиоценозе ротоглотки пациентов из группы «Острая пневмония» преобладал *H.respiratory syncytial virus* (частота встречаемости в выборке 13%) (Самсыгина Г.А., 2006; Ruuskanen O. et. al., 2011; Nowicki J. et. al., 2020).

Для подтверждения прогностической ценности разработанных математических моделей («Дисбиоз» и «Вирус») использовали результаты биохимического анализа слюны (КЖК) пациентов тех же двух групп «Острый бронхит» и «Острая пневмония» (Рисунок 2а, б).

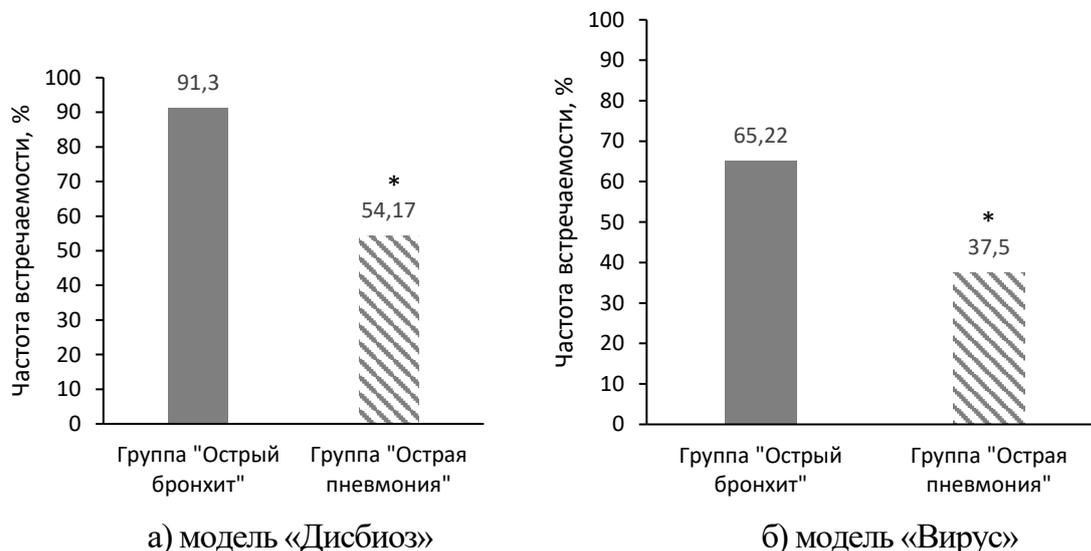


Рисунок 2 – Частоты встречаемости дисбиозов бактериальной и вирусной этиологии, рассчитанных по классификационным уравнениям моделей «Дисбиоз» (а) и «Вирус» (б) в группах детей «Острый бронхит» и «Острая пневмония»

Примечание: отмечено статистически значимое отличие между группами, рассчитанно по критерию согласия Пирсона (Хи-квадрат), $p < 0,05$

Исследование частоты встречаемости специфического соотношения концентраций КЖК в слюне, характерного для дисбиоза ротоглотки бактериальной и/или вирусной этиологии по уже разработанным моделям показало (Рисунок 2а, б), что у детей в группе «Острый бронхит» дисбиозы ротоглотки бактериальной и вирусной этиологии встречаются чаще (частота встречаемости 91,3% и 65,2% соответственно), чем у детей в группе «Острая пневмо-

ния» (частота встречаемости 54,2% и 37,5% соответственно). Эти данные совпадают с интерпретацией результатов, полученных бактериологическими и молекулярно-генетическими методами.

У детей исследуемых групп также изучена частота встречаемости микробиоценозов ротоглотки, вызванных микст-инфекцией (Рисунок 3).

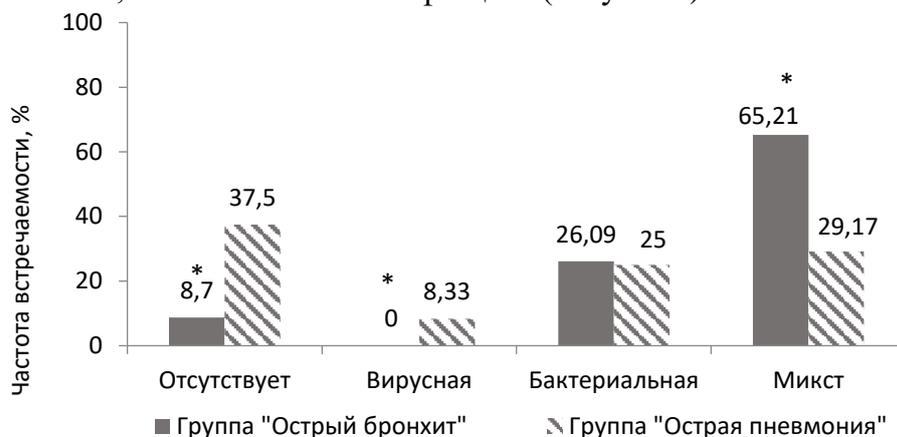


Рисунок 3 – Частоты встречаемости микробиоценозов бактериальной, вирусной и сочетанной (микст) этиологии в группах детей «Острый бронхит» и «Острая пневмония»

Примечание: * - отмечено статистически значимое отличие между группами, рассчитанно по критерию согласия Пирсона (Chi-квадрат), $p < 0,05$

Установлено (Рисунок 3), что у детей из группы «Острый бронхит» присутствие в микробиоценозе ротоглотки респираторного вируса всегда сопровождается дисбиотическими изменениями, связанными с высокой бактериальной колонизацией, и встречается в 65,2% случаев, в то время как у детей группы «Острая пневмония» микст-инфекция встречается в 29,2% случаев.

Таким образом, с помощью метода микробиом-ассоциированной метаболомики в работе показана эффективность разработанных моделей «Дисбиоз» и «Вирус», а также установлено усиление дисбиоза ротоглотки в присутствии респираторного вируса, что совпадает с современными представлениями об этиологической структуре и патогенезе острых инфекционных заболеваний дыхательных путей (Nowicki J. et. al., 2020).

Характеристика функционального состояния микробиоценоза ротоглотки у часто болеющих детей

Этот же алгоритм исследования был применен для двух групп пациентов, находящихся в острой фазе бронхита или внебольничной пневмонии, и отнесенных по критериям В.Ю. Альбицкого и А.А. Баранова к группам часто и эпизодически болеющих детей («ЧБД», «ЭБД») (Альбицкий В.Ю. и др., 1986).

Для оценки функциональной активности микробиоценоза ротоглотки у детей из групп «ЧБД» и «ЭБД» с острым бронхитом или острой внебольничной пневмонией проводили биохимический анализ слюны. Определили, что функциональная активность микробиоценоза ротоглотки имеет статистически значимые ($p < 0,05$) различия только для структурного индекса, характеризующего активность индигенной микрофлоры. У детей группы «ЧБД» он составил 0,23 ед., у детей группы «ЭБД» - 0,29 ед. Для остальных показателей функциональной активности микробиоценоза ротоглотки детей обеих групп статистически значимых отличий не найдено.

Проведение бактериологических исследований мазков из ротоглотки пациентов для сравнения частот встречаемости и интенсивности обсемененности разными бактериями показало, что для детей из групп «ЧБД» и «ЭБД» характерно присутствие в ротоглотке представителей нормальной микрофлоры - *Streptococcus spp. a-hem*, *Neisseria spp.* с интенсивностью обсемененности 6-7 lg КОЕ/г и статистически значимым ($p < 0,05$) увеличением частоты встреча-

емости *Enterobacter spp.* в группе «ЭБД» (на 6%), и *Pseudomonas spp.* в группе «ЧБД» (на 7%). Установлено, что количественный и качественный состав микроорганизмов в ротоглотке детей из групп «ЧБД» и «ЭБД», определяемый бактериологическим методом, имеет незначительные отличия.

Методом ПЦР-РВ проведено сравнение частот встречаемости разных респираторных вирусов в мазках из зева и носа у детей из групп «ЧБД» и «ЭБД» показало, что у детей группы «ЧБД» статистически значимо ($p < 0,05$) чаще определяются РНК *H.rhinovirus* (частота встречаемости 22%) и *I.virus B* (частота встречаемости 7%). Другие респираторные вирусы определяются реже. У детей из группы «ЭБД» выявлено статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение частот встречаемости в мазках из зева и носа РНК/ДНК *H.respiratory syncytial virus* (на 13%), *H.adenovirus* (на 6%).

Для подтверждения прогностической ценности разработанных математических моделей («Дисбиоз» и «Вирус») использовали результаты биохимического анализа слюны (КЖК) пациентов тех же двух групп «ЧБД» и «ЭБД».

Установлено, что по математическим моделям («Дисбиоз», «Вирус») частота встречаемости специфического соотношения концентраций КЖК в слюне пациентов исследуемых групп «ЧБД» и «ЭБД», характерная для дисбиоза ротоглотки бактериальной или вирусной этиологии, не имеет статистически значимых отличий (Рисунок 4а, б).

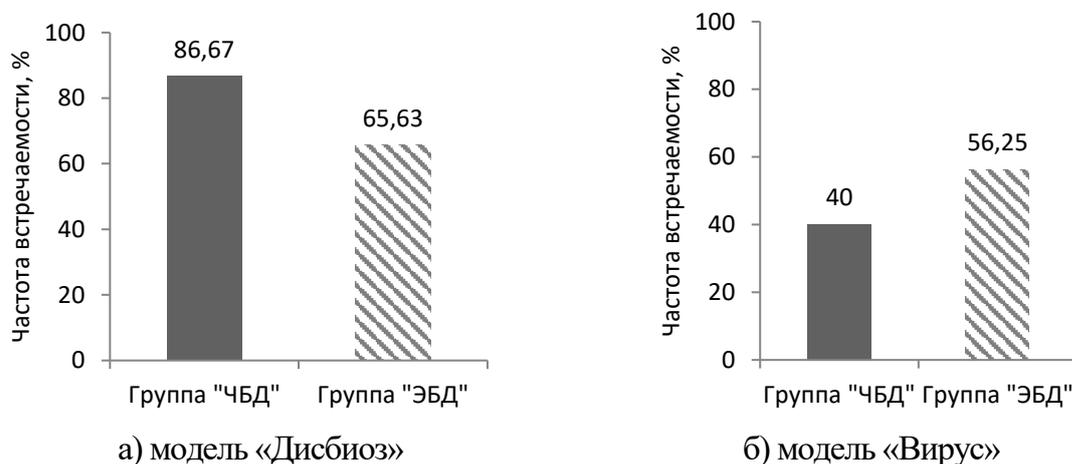


Рисунок 4 – Частоты встречаемости дисбиозов бактериальной и вирусной этиологии, рассчитанных по классификационным уравнениям моделей «Дисбиоз» (а) «Вирус» (б) в группах детей «ЧБД» и «ЭБД»

Также изучали соотношения частот встречаемости микробиоценозов ротоглотки бактериальной, вирусной и сочетанной (микст) этиологии в исследуемых группах детей (Рисунок 5).

Установлено, что изменения функциональной активности микробиоценоза ротоглотки в обеих группах наиболее выражено при микст-инфекции. Частота встречаемости микст-инфекции в группе «ЧБД» составляет 40%, в группе «ЭБД» - 50%.

В этой же исследуемой когорте детей возрасте от 7 до 14 лет, находящихся на стационарном лечении с диагнозами острый бронхит или острая внебольничная пневмония, методом микробиом-ассоциированной метаболомики определили влияние вирусов и их ассоциаций на функциональную активность микробиоценоза ротоглотки у детей. Сравнивали средние значения коэффициентов уникальности математических моделей «Вирус» и «Дисбиоз» при наличии в микробиоценозе ротоглотки различных видов вирусов и их ассоциаций (Таблица 8).

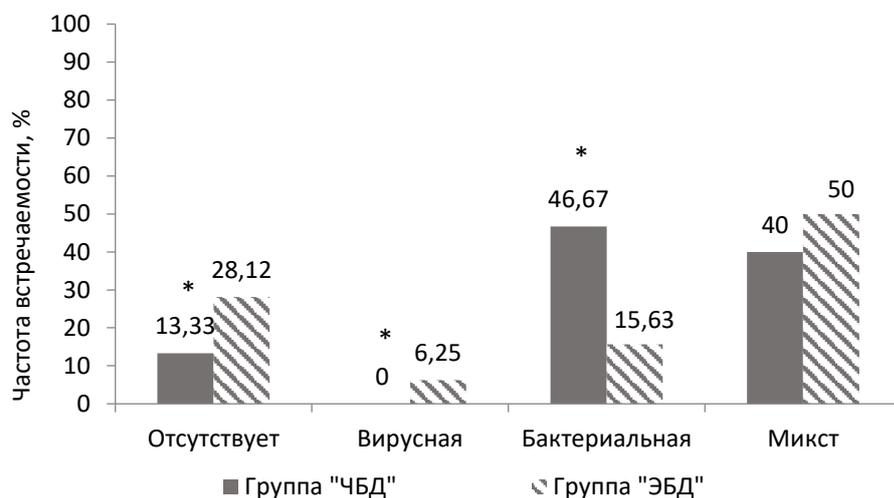


Рисунок 5 – Частоты встречаемости микробиоценозов бактериальной, вирусной и сочетанной (микст) этиологии в группах детей «ЧБД» и «ЭБД»

Примечание: * - отмечено статистически значимое отличие между группами, рассчитанно по критерию согласия Пирсона (Chi-квадрат), $p < 0,05$

Таблица 8 – Коэффициент уникальности модели «Вирус» и «Дисбиоз» для различных ассоциаций респираторных вирусов

Вирусы	Коэффициент уникальности модели:	
	«Вирус»	«Дисбиоз»
<i>H.rhinovirus</i> + <i>Epstein-Barr virus</i>	0,974	0,795
<i>H.parainfluenza virus</i> 1/3, 2/4	0,879	0,789
<i>H.metapneumovirus</i> + <i>Epstein-Barr virus</i>	0,846	0,862
<i>H.respiratory syncytial virus</i>	0,823	0,737
<i>H.rhinovirus</i>	0,801	0,842
<i>H.metapneumovirus</i>	0,783	0,792
<i>H.respiratory syncytial virus</i> + <i>H.adenovirus</i>	0,712	0,772
<i>I.virus A</i>	0,688	0,549
<i>H.metapneumovirus</i> + <i>H.adenovirus</i>	0,48	0,975

При изучении (Таблица 8) полученных коэффициентов уникальности модели «Вирус» было установлено, что *Epstein-Barr virus* в исследуемой выборке всегда определялся в комбинации с другими респираторными вирусами и усиливал функциональную активность микробиоценоза ротоглотки (*H. rhinovirus* – коэффициент уникальности равен 0,801, в ассоциации с *Epstein-Barr virus* — 0,971; *H. metapneumovirus* — 0,783, в ассоциации — 0,846). *H.adenovirus* в исследуемой выборке также встречался в ассоциации с другими респираторными вирусами. Однако ассоциация *H.adenovirus* с другими респираторными вирусами меняет метаболический профиль микробиоценоза ротоглотки, ослабляя действие другого вируса (*H.metapneumovirus* — коэффициент уникальности равен 0,783, в ассоциации с *H.adenovirus* — 0,48).

При изучении степени выраженности бактериальных дисбиотических изменений ротоглотки детей в группах «ЧБД» и «ЭБД» (по коэффициенту уникальности) показано, что присутствие респираторного вируса всегда способствует усилению этих дисбиотических нарушений. Коэффициенты уникальности для модели «Дисбиоз» при всех исследуемых видах вируса и их ассоциациях выше 0,6, что расценивается как согласованность от умеренной до высокой.

Разработка компьютерной программы интегральной оценки микробиоценоза ротоглотки у детей по концентрациям короткоцепочечных жирных кислот в слюне

На третьем этапе работы была создана и запатентована компьютерная программа для использования в сфере практического здравоохранения.

Разработанный алгоритм компьютерной программы «Дисбиоз-скрин» представлен на рисунке 6.

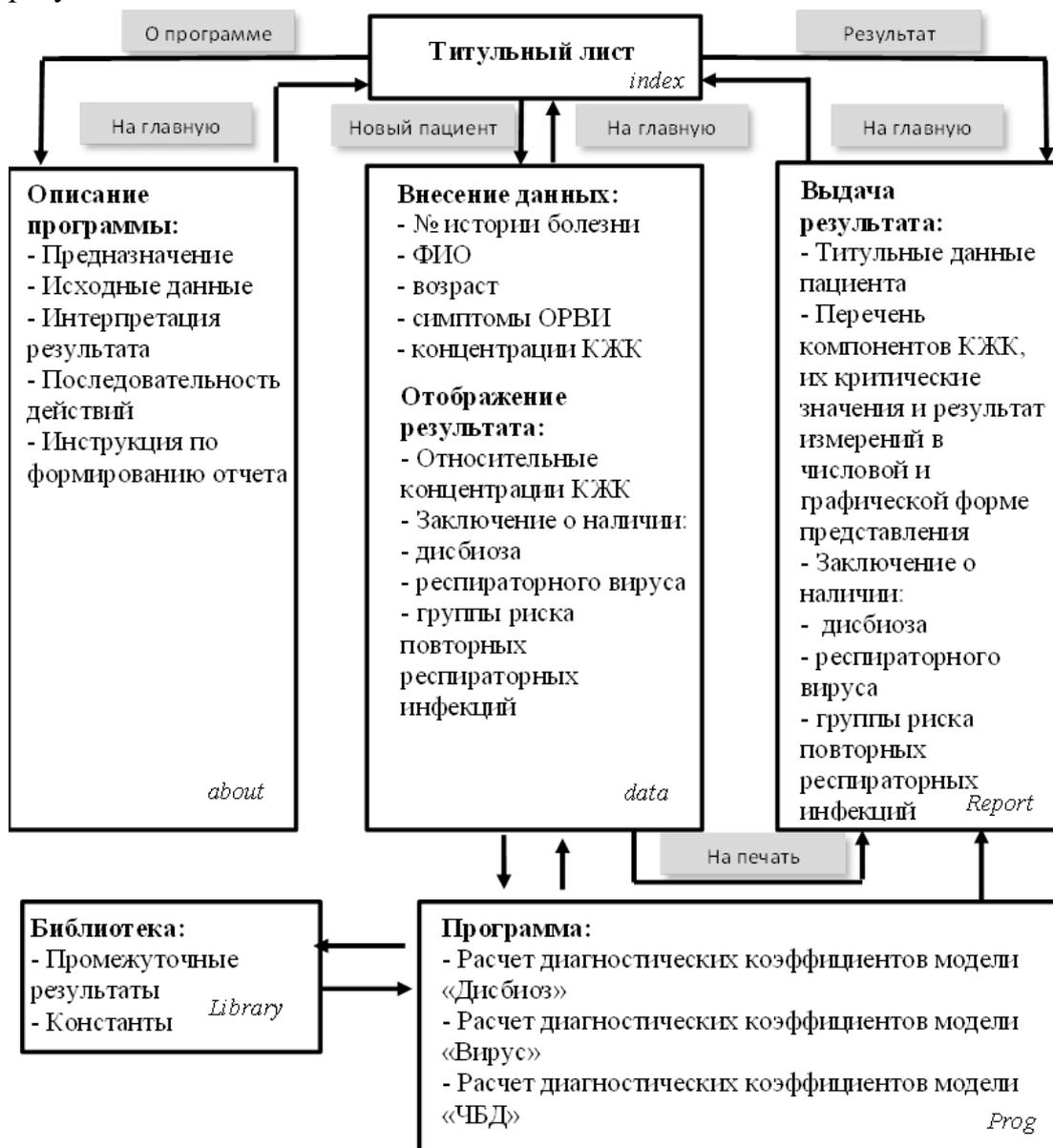


Рисунок 6 – Алгоритм компьютерной программы «Дисбиоз-скрин», написанной в программной среде Excel

Программа «Дисбиоз-скрин» по функциональной активности микробиоценоза ротоглотки ребенка позволяет проводить предиктивную диагностику этиологии острого респираторного заболевания, а также определяет возможную принадлежность его к группе часто болеющих детей. Исходными данными служат концентрации короткоцепочечных жирных кислот в слюне, определяемые методом газо-жидкостной хроматографии (Рисунок 7).

Дисбиоз - скрин

История болезни:

ФНО:

Возраст (до 14 лет):

Присутствуют ли признаки ОРВИ (температура более 37,5, озноб, насморк, кашель, чихание, головная боль, боль в горле, боль в глазных яблоках, слабость)?

да / нет

Короткоцепочечные-жирные кислоты в слюне

Концентрации КЖК			Профили			
Уксусной	ммоль/л	39,04088	C2	Уксусной	ед.	0,602
Пропионовой	ммоль/л	21,62106	C3	Пропионовой	ед.	0,333
Изомасляной	ммоль/л	1,206587	C4	Изомасляной	ед.	0,019
Масляной	ммоль/л	2,208863	C4	Масляной	ед.	0,034
Изовалериановой	ммоль/л	0,618157	C5	Изовалериановой	ед.	0,010
Валериановой	ммоль/л	0,119356	C5	Валериановой	ед.	0,002
Изокапроновой	ммоль/л	0,017241	C6	Изокапроновой	ед.	0,000
Капроновой	ммоль/л	0,027241	C6	Капроновой	ед.	0,000
Суммарная конц-я	ммоль/л	64,85939		Структурный индекс	ед.	0,661
				Индекс изокилот	ед.	0,782

Результаты биохимического анализа слюны указывают на отсутствие маркеров дисбиоза ротоглотки.
 Не выявлены маркеры присутствия респираторного вируса.
 Не выявлено состояние микробиоценоза ротоглотки, специфическое для когорты часто болеющих детей.

Рисунок 7 – Лист ввода первичных данных компьютерной программы «Дисбиоз-скрин»

Программа переводит концентрации КЖК в относительные концентрации, которые являются исходными переменными для расчетов по математическим моделям (Рисунок 8).

Дисбиоз - скрин

Пример анализа

Результаты лабораторного исследования

Короткоцепочечные жирные кислоты в слюне

Концентрации	Референсные значения	Пациент
Уксусной кислоты	[0-0,758]	0,602
Пропионовой кислоты	[0,339 - 1]	0,333
Изомасляной кислоты	[0,022 - 1]	0,019
Масляной кислоты	[0,028 - 1]	0,034
Изовалериановой кислоты	[0,005 - 1]	0,010
Валериановой кислоты	[0,017 - 1]	0,002
Изокапроновой кислоты	[0,001 - 1]	0,000
Капроновой кислоты	[0,001 - 1]	0,000
Суммарная концентрация	[92,46 +]	64,859
Структурный индекс	[0,389 +]	0,661
Индекс изокилот	[1,311 +]	0,782

Результаты предиктивного анализа

Результаты биохимического анализа слюны указывают на отсутствие маркеров дисбиоза ротоглотки.
 Не выявлены маркеры присутствия респираторного вируса.
 Не выявлено состояние микробиоценоза ротоглотки, специфическое для когорты часто болеющих детей.

Рисунок 8 – Лист выдачи протокола исследования и заключения компьютерной программы «Дисбиоз-скрин»

Проводится расчет суммарной концентрации кислот, структурного индекса и индекса изокилот, выводится графическое изображение, указывающее на отношение полученных величин к границам их референсных значений. Заключение, сформированное по итогам расчета классификационных уравнений, содержит информацию о выявленных дисбиотических изменениях ротоглотки ребенка бактериальной и/или вирусной этиологии, а также о принадлежности ребенка к группе часто болеющих детей.

В основе определения наличия дисбиоза ротоглотки, присутствия респираторного вируса или отнесения пациента к группе часто болеющих детей лежат классификационные уравнения математических моделей линейного дискриминантного анализа «Дисбиоз», «Вирус», «ЧБД» и «ЧБД+».

ВЫВОДЫ

1. Изучена функциональная активность микробиоценоза ротоглотки людей в возрасте от 4-х месяцев до 85 лет. Для ее характеристики отобраны наиболее информативные критерии - структурный индекс ($AUC=0,966$) и индекс изокислот ($AUC=0,812$), для которых определены 3 этапа изменений (с рождения до 4 месяцев, от 4 месяцев до 14 лет и от 14 лет и старше).

2. Рассчитаны референсные значения критериев функциональной активности микробиоценоза ротоглотки для детей в возрасте от 4 месяцев до 14 лет: структурный индекс от 0,389 единиц и выше; индекс изокислот - от 1,311 единиц и ниже.

3. Разработаны и охарактеризованы математические модели оценки дисбиотических изменений микробиоценоза ротоглотки у детей на основе показателей ее функциональной активности: «Дисбиоз» - для оценки бактериальной обсемененности ротоглотки; «Вирус» - для оценки присутствия респираторного вируса в микробиоценозе ротоглотки; «ЧБД» и «ЧБД+» - для отнесения детей к группе часто болеющих (в остром периоде инфекционного заболевания и в состоянии клинической ремиссии).

4. Классическими лабораторными методами исследования (бактериологическим, биохимическим, молекулярно-генетическим) показано, что применение математических моделей «Дисбиоз», «Вирус», «ЧБД», «ЧБД+», созданных с использованием метода микробиом-ассоциированной метабомики, дополняют возможности оценки микробиоценоза ротоглотки у пациентов детского возраста.

5. Разработана и запатентована программа «Дисбиоз-скрин» для предиктивной диагностики дисбиотических нарушений микробиоценоза ротоглотки у детей, связанных с высокой бактериальной колонизацией и/или присутствием респираторного вируса, а также для определения возможной принадлежности ребенка к группе часто болеющих детей.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для оценки функциональной активности микробиоценоза ротоглотки рекомендуется учитывать возраст пациента, так как значения показателей функциональной активности микробиоты ротоглотки остаются постоянными в рамках трех возрастных групп: от рождения до 4 месяцев, от 4 месяцев до 14 лет и старше 14 лет.

2. Для оценки состояния микробиоценоза ротоглотки у пациента в возрасте от 4 месяцев до 14 лет рекомендуется использовать два основных критерия функциональной активности: структурный индекс (референсное значение 0,389 ед.), с помощью которого оценивается вклад в метаболизм индигенной анаэробной микрофлоры, а также индекс изокислот (референсное значение 1,311 ед.) – для оценки протеолитически активных микроорганизмов.

3. Разработанную на базе биоинформационного алгоритма компьютерную программу «Дисбиоз-скрин» рекомендуется применять для 1) предиктивной диагностики этиологии острых респираторных заболеваний детей с целью обоснования необходимости назначения антибактериальной или противовирусной терапии; 2) скрининговых исследований функциональной активности микробиоценоза ротоглотки в детских коллективах (дошкольные, школьные, санаторные, реабилитационные и другие организации) при их формировании в целях выявления детей, нуждающихся в коррекции дисбиотических нарушений бактериальной и/или вирусной этиологии, а также формирования групп часто болеющих и эпизодически болеющих детей.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

В последующие годы исследования необходимо направить в сторону использования линейного дискриминантного анализа концентраций короткоцепочечных жирных кислот в слюне при исследовании состояния микробиоценоза ротоглотки для таких респираторных инфекций, как ларингит, трахеит, пневмоцистоз и т.д., а также социально-значимых инфекций, таких как туберкулез, корь, краснуха, дифтерия, менингит и прочие.

В дальнейшем планируется применить аппарат математического моделирования для исследования функциональной активности микробиоценоза ротоглотки, используя расширенный спектр определяемых метаболитов. Увеличение количества определяемых метаболитов в слюне будет осуществлено при помощи перевода короткоцепочечных жирных кислот в метиловые эфиры.

Планируется использовать метод микробиом-ассоциированной метаболомики не только для предиктивной диагностики дисбиотических нарушений микробиоценоза ротоглотки у детей при респираторных заболеваниях, но и для коррекции дисбиотических нарушений, выявленных при скрининговых исследованиях в дошкольных, школьных, санаторных, реабилитационных организациях.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Селькова, Е.П. Респираторные вирусы в этиологии риносинусита и острого среднего гнойного отита у детей / Е.П. Селькова, Е.Ю. Радциг, А.К.О. Бугайчук, Л.В. Малыгина, А.С. Лапицкая, Н.В. Гудова, Т.А. Гренкова // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. - 2015. - № 3. - С. 21-23.

2. Затевалов, А.М. Маркеры состояния микробиоценоза кишечника и ротоглотки у пациентов с острыми респираторными заболеваниями / А.М. Затевалов, Е.П. Селькова, С.С. Афанасьев, Е.А. Воропаева, Е.А. Медведева, Н.В. Гудова // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. - 2016. - № 1-2. - С. М12-М12а.

3. Затевалов, А.М. Оценка степени микробиологических нарушений микрофлоры ротоглотки и кишечника с помощью методов математического моделирования / А.М. Затевалов, Е.П. Селькова, С.С. Афанасьев, А.В. Алешкин, А.Ю. Миронов, М.П. Гусарова, Н.В. Гудова // Клиническая лабораторная диагностика. - 2016. - Т. 61, № 2. - С. 117-121.

4. Затевалов, А.М. Возрастная динамика продукции короткоцепочечных жирных кислот микробиотой ротоглотки у пациентов, не имеющих заболеваний респираторного тракта и ротовой полости / А.М. Затевалов, Е.П. Селькова, Н.В. Гудова, А.С. Оганесян // Альманах клинической медицины. - 2018. - Т. 46, № 8. - С. 784-791.

5. Гудова, Н.В. Определение наличия респираторного вируса методом математического моделирования функционального состояния микробиоценоза // Н.В. Гудова, А.М. Затевалов // Журнал инфектологии. - 2019. - Т. 11, № 1 S1. - С. 43-44.

6. Затевалов, А.М. Референсные значения короткоцепочечных жирных кислот в слюне у пациентов ОРВИ без респираторной патологии / А.М. Затевалов, Н.В. Гудова, А.С. Оганесян, Е.П. Селькова, А.Ю. Миронов, О.Г. Гречишникова // Клиническая лабораторная диагностика. - 2019. - Т. 64, № 3. - С. 153-157.

7. Затевалов, А.М. Практическое применение микробиом-ассоциированной метаболомики для интегральной оценки состояния микробиоценоза респираторного тракта / А.М. Затевалов, А.С. Оганесян, Н.В. Гудова, Е.П. Селькова, А.Ю. Миронов // Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации. Сборник материалов VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – М., 2019. - С. 77-84.

ПАТЕНТЫ НА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Патент RU 2 741 508 C1 Российская Федерация, МПК A61B 5/08, G01N 33/92, G01N 33/558. Способ диагностики респираторной вирусной инфекции у детей /

Н.В. Гудова, Е.П. Селькова, А.М. Затевалов, А.С. Оганесян, Э.Р. Мехтиев; заявитель и правообладатель Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – № 2020120459; заявл. 19.06.2020; опубл. 26.01.2021; Бюл. № 3. – 10 с.

2. Патент RU 2 741 709 C1 Российская Федерация, МПК А61В 5/00, G01N 33/487, G01N 30/12. Способ оценки состояния дисбиоза ротоглотки у детей / Н.В. Гудова, Е.П. Селькова, А.М. Затевалов, А.С. Оганесян, Э.Р. Мехтиев; заявитель и правообладатель Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – № 2020120457; заявл. 19.06.2020; опубл. 28.01.2021; Бюл. № 4. – 10 с.

3. Патент RU 2 742 756 C1 Российская Федерация, МПК А61В 5/00, G01N 33/487, G01N 30/12, G01N 33/92. Способ прогнозирования повторных респираторных инфекций у детей / Н.В. Гудова, Е.П. Селькова, А.М. Затевалов, А.С. Оганесян, Э.Р. Мехтиев; заявитель и правообладатель Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – № 2020120455; заявл. 19.06.2020; опубл. 10.02.2021; Бюл. № 4. – 13 с.

СВИДЕТЕЛЬСТВО О РЕГИСТРАЦИИ

Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ 2021610894. Дисбиоз-скрин экспресс / Н.В. Гудова, Е.П. Селькова, А.М. Затевалов, А.С. Оганесян, Э.Р. Мехтиев; заявитель и правообладатель Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – № 2020667858; заявл. 29.12.2020; опубл. 19.01.2021.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КЖК - короткоцепочечные жирные кислоты

КОЕ – колонии образующие единицы

ОРЗ – острые респираторные заболевания

ОРВИ – острые респираторные вирусные инфекции

ПЦР-РВ - полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

РНК – рибонуклеиновая кислота

ЧБД - часто болеющие дети

ЭБД – эпизодически болеющие дети

AUC – площадь по ROC-кривой

C2 – относительная концентрация уксусной кислоты

C3 – относительная концентрация пропионовой кислоты

iC4 – относительная концентрация изомасляной кислоты

C4 – относительная концентрация масляной кислоты

iC5 – относительная концентрация изовалериановой кислоты

C5 – относительная концентрация валериановой кислоты

iC6 - относительная концентрация изокапроновой кислоты

C6 – относительная концентрация капроновой кислоты

FFAP – полиэтиленгликоль модифицированный нитротерефталатом

ROC-анализ – математическая модель бинарного классификатора