

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

На правах рукописи

Гудова Наталия Владимировна

Изучение микробиоценоза ротоглотки у детей методом микробиом-
ассоциированной метаболомики

1.5.11 - микробиология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Затевалов Александр Михайлович

Москва – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Актуальность темы исследования	4
Степень разработанности темы исследования.....	5
Цель исследования	6
Задачи исследования.....	7
Научная новизна.....	7
Теоретическая и практическая значимость	9
Методология и методы исследования.....	10
Объекты исследования	11
Бактериологические методы исследования.....	13
Молекулярно-генетические методы исследования	15
Биохимические методы исследования	16
Статистические методы исследования	17
Математическое моделирование	17
Личное участие автора в получении результатов.....	21
Основные положения диссертации, выносимые на защиту	22
Степень достоверности и апробация результатов исследования.....	23
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	25
1.1. Состав микробиоты ротоглотки у человека	25
1.2. Этиология острых респираторных заболеваний у детей	26
1.3. Колонизационная резистентность и защитная функция микробиоценоза ротоглотки.....	27
1.4. Особенности функционального состояния микробиоценоза ротоглотки у часто болеющих детей	31
1.5. Роль микробиом-ассоциированной метаболомики в предиктивной диагностике заболеваний	36
1.6. Использование линейного дискриминантного анализа в микробиом-ассоциированной метаболомике.....	41
Заключение по главе	43
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	44
ГЛАВА 2. Функциональная активность микробиоценоза ротоглотки у людей	44

2.1. Оценка функциональной активности микробиоценоза ротоглотки у людей в разных возрастных группах	44
2.2. Определение референсных значений концентраций короткоцепочечных жирных кислот в слюне у детей в возрасте от 4 месяцев до 14 лет.....	53
2.3. Создание математической диагностико-прогностической модели дисбиотических изменений ротоглотки у детей.....	58
2.3.1. Модель диагностики микробиологических нарушений микробиоценоза ротоглотки у детей	60
2.3.2. Модель диагностики вирусной респираторной инфекции у детей.....	65
2.3.3. Модель выявления часто болеющих детей в острый период заболевания	70
2.3.4. Модель выявления часто болеющих детей, находящихся в состоянии клинической ремиссии.....	75
Заключение по главе	80
ГЛАВА 3. Оценка особенностей микробиоценозов ротоглотки у детей, выявленных методом математического моделирования	82
3.1. Характеристика функционального состояния микробиоценоза ротоглотки при остром бронхите и острой внебольничной пневмонии у детей (по математическим моделям).....	83
3.2. Характеристика функционального состояния микробиоценоза ротоглотки у часто болеющих детей (по математическим моделям).....	92
Заключение по главе	100
ГЛАВА 4. Разработка компьютерной программы интегральной оценки микробиоценоза ротоглотки у детей по концентрациям короткоцепочечных жирных кислот в слюне	102
Заключение	113
Выводы	125
Практические рекомендации	126
Перспективы дальнейшей разработки темы	127
Список сокращений	128
Список использованной литературы.....	129

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Ведущее место в структуре инфекционных и паразитарных болезней занимают острые инфекции верхних дыхательных путей множественной и неуточненной локализации. Среднемноголетняя заболеваемость этой группы инфекций в Российской Федерации за период с 2010–2021 гг. составила около 21 тысячи на 100 тыс. населения и не претерпела за это время значительных изменений. Самые высокие показатели заболеваемости острыми респираторными вирусными инфекциями (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) [62, 63, 81].

Одним из самых серьезных осложнений ОРВИ и гриппа являются внебольничные пневмонии. Максимальный показатель заболеваемости внебольничными пневмониями регистрировался среди детского населения также в возрастной группе 1-2 года (1337,49 на 100 тыс.). Сохраняется тенденция полиэтиологичности пневмоний. В 2021 году наибольший вклад вносили пневмонии, вызванные вирусами (в том числе COVID-19) (265,06 на 100 тыс. населения) [1, 62, 63].

Ежегодно 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 [14, 62, 63, 167].

Лабораторная диагностика острых респираторных заболеваний (ОРЗ) из-за большого числа этиологических агентов сложная, не всегда доступна и своевременна. В связи с этим эффективная адекватная этиотропная терапия назначается не всегда и порой в поздние сроки [60, 172]. Прогнозирование течения заболевания может вызывать затруднения. Учитывая также высокий процент осложнений в виде бронхитов и внебольничных пневмоний, разработка нового направления предиктивной медицины, предназначенного для определения возбудителя, прогноза течения ОРЗ, весьма актуальна.

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 [26, 78, 105, 147].

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.

Использование метаболитов для предиктивной диагностики заболеваний было предложено J.K. Nicholson, который утверждал, что вся информация о функциональном состоянии организма содержится в его биологических жидкостях [157]. В работах Затевалова А.М. было показано, что для дифференциальной диагностики заболеваний верхних дыхательных путей можно использовать концентрации метаболитов микробиоты ротоглотки, а именно короткоцепочечных жирных кислот, получаемых методом газо-жидкостной хроматографии, с последующей предиктивной диагностикой заболевания на основе метода линейного дискриминантного анализа (ЛДА) [30]. В работах Безродного С.Л. показано, что для диагностики сахарного диабета 2 типа и дислипидемии у лиц пожилого возраста возможно использование концентраций компонентов клеточной стенки микроорганизмов в крови, получаемых методом газовой хроматографии - масс-спектрометрии, также с последующей предиктивной диагностикой заболевания на основе метода линейного дискриминантного анализа [10].

Предлагаемый нами метод микробиом-ассоциированной метаболомики (МММ) дает возможность определить присутствие респираторного вируса в слизистой оболочке верхних дыхательных путей по специфическому

соотношению концентраций короткоцепочечных жирных кислот (КЖК) в слюне, полученных методом линейного дискриминантного анализа их концентраций [61, 76].

Серьезной проблемой в педиатрической практике является своевременное выявление и лечение детей с повторными заболеваниями дыхательных путей [102, 128, 131, 133, 134, 149]. В последние десятилетия проведено большое количество исследований, целью которых было определение критериев включения ребенка в группу часто болеющих детей (ЧБД). В результате изучения видового состава микрофлоры и популяций иммунных клеток установлены группы риска и разработаны критерии, позволяющие отнести ребенка в группу часто болеющих детей. Более точному определению критериев включения детей в группу часто болеющих способствует применение микробиом-ассоциированной метаболомики для расчета решающих правил, отражающих специфическое состояние функциональной активности микробиоценоза ротоглотки у часто болеющих детей [4, 9, 29, 39, 44, 71].

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

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 изокислот (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

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 клинико-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 локальным Этическим комитетом ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (протокол № 37 от 05.12.2019 года).

Объекты исследования

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

Изучены результаты анализов 683 пациентов, в возрасте от 1 месяца до 85 лет, которые обратились для сдачи анализа слюны на комплексное исследование в консультативно-диагностический центр (КДЦ) при ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора в 2011-2018гг. Из них было 79% женщины и 21% мужчины. У всех обратившихся был проведен бактериологический анализ мазков из ротоглотки и газо-жидкостное хроматографическое (ГЖХ) исследование образцов слюны на содержание короткоцепочечных жирных кислот. Мазки из ротоглотки брала медицинская сестра в процедурном кабинете КДЦ стерильным тампоном-зондом в пробирку с транспортной средой AMIES (COPAN, Италия). Слюну собирала в конические полимерные медицинские пробирки с пробкой. С момента последнего приема пищи пациентом должно было пройти не менее 2 часов. В исследование не принимали пациентов с заболеваниями верхних дыхательных путей, острыми респираторными заболеваниями. Гендерные различия не учитывали. Результаты исследования изложены в главах 2.1. «Оценка функциональной активности микробиоценоза ротоглотки у людей в разных возрастных группах», 2.2 «Определение референсных значений

концентраций короткоцепочечных жирных кислот в слюне у детей в возрасте от 4 месяцев до 14 лет» и 2.3.1. «Модель диагностики микробиологических нарушений микробиоценоза ротоглотки у детей».

Изучены результаты анализов 47 детей в возрасте от 7 до 14 лет (из них 15 (32%) - женского и 32 (68%) – мужского пола) 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. Был проведен бактериологический анализ мазков из ротоглотки, молекулярно-генетический анализ мазков из зева и носа и газо-жидкостное хроматографическое исследование образцов слюны. Мазки из ротоглотки, мазки из зева и носа и слюну собирала медицинская сестра учреждения в день поступления ребенка в стационар. Гендерные различия не учитывали. Результаты исследования изложены в главах 2.3.2. «Модель диагностики вирусной респираторной инфекции у детей», 2.3.3. «Модель выявления часто болеющих детей в острый период заболевания», 3.1. «Характеристика функционального состояния микробиоценоза ротоглотки при остром бронхите и острой внебольничной пневмонии у детей» и 3.2. «Характеристика функционального состояния микробиоценоза ротоглотки у часто болеющих детей».

Изучены результаты анализов 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 (из них 54 (28%) - женского и 139 (72%) - мужского пола) и не имели острых респираторных заболеваний на момент взятия у них материала на анализ. Был проведен бактериологический анализ мазков из ротоглотки и газо-жидкостное хроматографическое исследование образцов слюны. Мазки из ротоглотки и слюну собирала медицинская сестра учреждения в день поступления ребенка в стационар. Гендерные различия не учитывали. Результаты исследования изложены в главе 2.3.2. «Модель выявления часто

болеющих детей, находящихся в состоянии клинической ремиссии».

Бактериологические методы исследования

Для бактериологического анализа мазков из ротоглотки использовали метод посева на питательные среды:

1. агар Эндо - дифференциально-диагностическая питательная среда, предназначенная для выделения энтеробактерий (ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, Россия);

2. желточно-солевой агар - селективная среда, предназначенная для культивирования стафилококков. Основа колумбийский агар (42,5 г/л) («Лабораториос КОНДА, С.А.», Испания), соль (65 г/л) (ООО «АО РЕАХИМ», Россия);

3. кровяной агар - ГРМ-агар с добавлением 5% крови крупного рогатого скота - питательная среда, предназначенная для выделения и культивирования прихотливых микроорганизмов, а также их первичной дифференциации по типу гемолиза (ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, Россия);

4. кандид-агар - питательная среда для выделения грибов рода *Candida*), (ХайМедиа Лабораториз ПВТ. лтд, Индия);

5. среда Уриселект - хромогенная питательная среда для обнаружения и дифференциации микроорганизмов («Био-Рад Лабораториез, САС.», Франция);

6. агар трехсахарный с железом - среда для дифференциации кишечных грамотрицательных энтеробактерий на основании ферментации углеводов и образования H_2S . Основа колумбийский агар (42,5 г/л) («Лабораториос КОНДА, С.А.», Испания), щелочь (20%, 10 капель/л) (ООО «Агат-Мед», Россия), лактоза (10г/л) (АО «ЛенРеактив», Россия), сахароза (10 г/л) (ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, Россия), мочевины (10г/л) (ООО ТД «ХИММЕД», Россия), сульфат железа (II) (0,2 г/л) (ООО ТД «ХИММЕД», Россия), гипосульфит (0,3 г/л) (ООО «Лабтех», Россия), индикатор

тимоловый синий (40 мл/л) (ООО «Лабтех», Россия), глюкоза (1 г/л) (ХайМедиа Лабораториз ПВТ. лтд, Индия);

7. агар Симмонса с цитратом - среда для дифференциации грамотрицательных кишечных бактерий на основании утилизации цитрата натрия в качестве источника углерода и утилизации неорганической соли аммония в качестве источника азота (ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, Россия);

8. полужидкий агар – питательная среда для оценки подвижности микроорганизма. Бульон с сердечно-мозговым экстрактом (37 г/л), колумбийский агар (0,4%, 4г/л) («Лабораториос КОНДА, С.А.», Испания);

9. сахара: глюкоза (ХайМедиа Лабораториз ПВТ. лтд, Индия);
- лактоза (ООО «Реактив», Россия), рамноза (ООО «Лаверна», Россия), сорбит (АО «ЛенРеактив», Россия) – основа среда Гисса (дистиллированная вода 1л, соль 0,5% 5г (ООО «АО РЕАХИМ», Россия), пептон основной сухой 1% 10г (ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, Россия), индикатор Андрее 1% 10г (дистиллированная вода 1л, фуксин кислый 2,5г, 1N щелочь 200мл) и соответствующий сахар 0,5% 5г;

- малонат натрия - дистиллированная вода 1л, дрожжевой экстракт 1г (ООО «Компания Пущинские лаборатории», Россия), аммоний сернокислый 2г (ООО «Лаверна», Россия), дигидроортофосфат калия 0,4г (ООО «Агат-Мед», Россия), гидроортофосфат калия 0,6г (ООО «Агат-Мед», Россия), соль 2г (ООО «АО РЕАХИМ», Россия), индикатор бромтимоловый синий 0,2% 12мл (дистиллированная вода 100мл, бромтимоловый синий 0,2г, 0,1N щелочь 1,6мл), малонат натрия 3г (ООО «Диаэм», Россия), глюкоза 0,25г (ХайМедиа Лабораториз ПВТ. лтд, Индия);

- кларк 14 г/л («Лабораториос КОНДА, С.А.», Испания);

10. среда МРС (бульон) – селективная среда, предназначенная для выделения лактобактерий («Лабораториос КОНДА, С.А.», Испания);

11. среда Блаурокк - селективная среда, предназначенная для выделения бифидобактерий (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) [65, 66].

Родовую идентификацию изолированных с кровяного агара штаммов *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia* проводили по алгоритму сопоставления биохимических реакций ферментации глюкозы, лактозы, рамнозы, сорбита, маллоната, по реакции гидролиза мочевины и образования сероводорода, на основании утилизации цитрата натрия и неорганической соли аммония, оценке подвижности - по характеру роста посева уколом в столбик, по реакции продукции индола, лизиндекарбоксилазной активности, реакции с метиловым красным, определения фенилаланиндезаминазы. Родовую идентификацию *Staphylococcus* проводили на желточно-солевом агаре Чистовича [16, 65, 66].

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 гибридизационно-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*));

- «АмплиПрайм® HSV / CMV» (вируса простого герпеса (*HSV*) и цитомегаловируса (*CMV*));

- "АмплиСенс EBV-скрин/монитор-FL" (ДНК вируса Эпштейна-Барр (*EBV*)).

Аmplификацию 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) [47, 59].

Биохимические методы исследования

Концентрации короткоцепочечных жирных кислот в слюне определяли методом газо-жидкостной 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 нитротерефталатом.

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 [6].

Методом газо-жидкостной хроматографии определяют концентрации масляной, уксусной, капроновой, пропионовой, валериановой кислот и их изомеров. На уксусную, пропионовую и масляную кислоты приходится 90% от массы всех вышеперечисленных кислот. Соотношение долей

концентраций уксусной, пропионовой, масляной кислот является критерием целостности микробного сообщества ротоглотки [2]. Структурный индекс, который рассчитывается как отношение суммы концентраций пропионовой, масляной, валериановой, капроновой кислот и их изомеров к концентрации уксусной кислоты в слюне - характеризует функциональную активность анаэробной микрофлоры ротоглотки. Индекс изокилот, который рассчитывается как отношение суммы концентраций изокилот к сумме концентраций линейных форм кислот в слюне – характеризует протеолитическую активность микрофлоры ротоглотки [95].

Статистические методы исследования

В настоящей работе использовали методы простой описательной статистики, а также математическое моделирование [17, 72, 82].

Математическое моделирование

В качестве средства математического моделирования использовали линейный дискриминантный анализ концентраций короткоцепочечных жирных кислот в слюне [17, 72, 82]. Алгоритм ЛДА предусматривает пошаговое построение моделей и исключение компонентов концентраций короткоцепочечных жирных кислот в слюне до момента, когда статистическая значимость всех включенных в модель компонентов будет соответствовать критерию $p < 0,05$. Линейный дискриминантный анализ относится к проекционным методам многомерной статистики. При сравнении групп отдельно по каждому параметру различия не всегда очевидны. В многомерном анализе учитываются одновременно несколько параметров. В дальнейшем специальным алгоритмом подбираются коэффициенты, минимизирующие перекрытия областей, то есть рассчитывается минимум математического ожидания потерь, либо минимум вероятности ложной классификации. Схема алгоритма линейного дискриминантного анализа представлена на рисунке 1 (а-д) [72, 82].

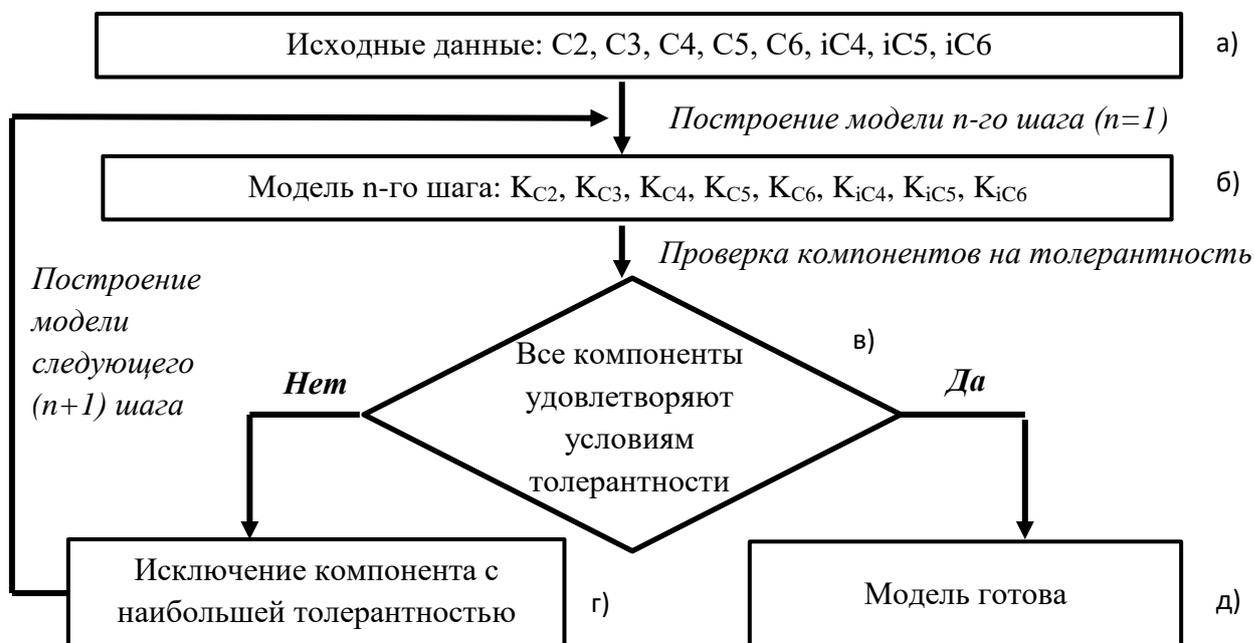


Рисунок 1 – Алгоритм построения модели линейного дискриминантного анализа

Примечание: а) внесение исходных данных концентраций короткоцепочечных жирных кислот в слюне в модель 1-го шага; б) построение модели на основе включения в нее концентраций компонентов короткоцепочечных жирных кислот в слюне; в) проверка толерантности концентраций компонентой короткоцепочечных жирных кислот в слюне и поиск кандидата на исключение из модели; г) исключение выбранного кандидата из модели и формирование нового списка концентраций компонентов короткоцепочечных жирных кислот в слюне, участвующих в построении модели следующего шага; д) для модели последнего шага рассчитываются качественные характеристики (специфичность, чувствительность, прогностическая точность), коэффициенты дискриминантной функции, координаты центроидов исследуемых групп, классификационные уравнения, расстояния Махаланобиса для каждого измерения

В результате математического моделирования определяются уравнения – дискриминантные функции, которые описывают оптимальную систему координат для разделения исследуемых групп. Также устанавливаются центроиды исследуемых групп – средние значения показателей, которые рассчитаны в виде координат точек дискриминантного пространства. Классификационными уравнениями – описывается равноудаленная от центроидов гиперплоскость, разделяющая многомерное пространство на области. По ближайшему центроиду – определяется

принадлежность объекта к одной из исследуемых групп. Расстояния между центроидами и исследуемым объектом могут быть проанализированы с целью определения динамики заболевания, эффективности лечения.

Классификационными уравнениями мы можем определить наличие/отсутствие дисбиоза, в том числе связанного с респираторным вирусом, или специфическим для часто болеющих детей. Количественную оценку специфических соотношений компонентов при изучаемых дисбиозах можно рассчитывать по расстояниям от центров. Этот показатель обозначается как коэффициент уникальности (Рисунок 2) и рассчитывается по формуле [51]:

Коэффициент уникальности (1) применяется в системах распознавания образов и характеризует согласованность данных классификации. В литературе представлены следующие оценки данного коэффициента (Таблица 1) [51].

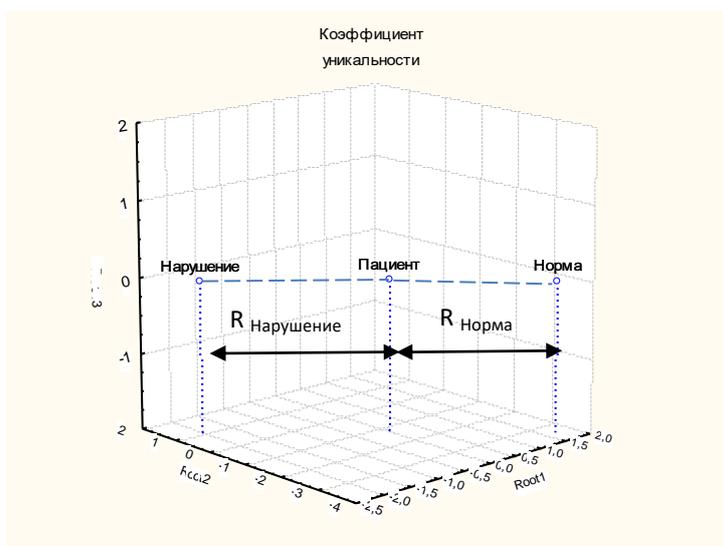


Рисунок 2 – Схема расчета коэффициента уникальности

$$1 - R_{\text{нарушение}} / R_{\text{нарушение}} + R_{\text{норма}}, \quad (1)$$

где

КУ – коэффициент уникальности, выраженный в единицах (0 – 1), определяющий глубину изменения соотношений КЖК при соответствующих нарушениях;

$R_{\text{нарушение}}$ – расстояние до центра группы «нарушение»;

$R_{\text{норма}}$ – расстояние до центра группы «норма».

Таблица 1 - Характеристика коэффициента уникальности

Значение коэффициента уникальности	Характеристика согласованности
0	нет согласованности
0 – 0,2	незначительная
0,2 – 0,4	слабая
0,4 – 0,6	умеренная
0,6 – 0,8	значительная
0,8 - 1	высокая

Коэффициент уникальности может использоваться для характеристики как отдельного микробиоценоза, так и для характеристики групп, динамики изменений, достоверности отличий по критериям Манна-Уитни или Стьюдента в зависимости от распределения показателей.

Описательный анализ порядковых и количественных данных проводили с использованием значений среднего арифметического со среднеквадратичным отклонением, при уровне 95% для доверительного интервала. При отсутствии нормального распределения средние значения представляли медианой с интерквартильным разбросом. Распределение качественных переменных представляли выборочной долей со стандартной ошибкой, при уровне 95% для доверительного интервала. Определение нормальности распределения выборок проводили по критерию Шапиро-Уилка, на основании значения которого выбирали между параметрическими и непараметрическими методами сравнения средних [17, 72, 82].

Сравнение статистической значимости различий между группами проводили методами параметрической или непараметрической статистики. Соответствие выборки исследуемых значений нормальному распределению проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для нормального распределения значений использовали t-критерий Стьюдента для связанных или несвязанных выборок. При отсутствии нормального распределения, или для порядкового и номинативного типа переменных, использовали непараметрическую статистику: U-критерий Манна-Уитни - для несвязанных выборок, и W-критерий Уилкоксона - для связанных выборок. Пороговый

уровень статистической значимости - альфа-ошибка $p < 0,05$ [17, 72, 82].

Сравнение частот встречаемости результатов исследований между изучаемыми группами проводили с использованием критерия согласия Пирсона (критерий Хи-квадрат, $p < 0,05$).

Исследования, включающие математическое моделирование, проводили с использованием бинарного классификатора (ROC-анализ) и линейного дискриминантного анализа.

Классификация по исследуемым группам соответственно предиктивному диагнозу проводилась на основании решающих правил, полученных алгоритмом линейного дискриминантного анализа приведенных концентраций КЖК в слюне. Использовался метод пошагового исключения переменных с критерием, рассчитанным по алгоритму анализа сопряженности. Классифицированные объекты сравнивали с их исходной принадлежностью к группе. В результате сравнения определяли количество ошибок 1 (ложноположительные) и 2 (ложноотрицательные) рода для оценки чувствительности, специфичности, прогностической точности рассчитываемой модели. По анализу отклонений от центроидов исследуемых значений в координатах дискриминантных функций, определяли статистическую значимость отличия между группами. Расстояние между центроидами определяли по правилам Евклидовой геометрии с учетом поправки на асимметрию матрицы (расстояние Махаланобиса).

Количественную оценку уникальных соотношений концентраций компонентов 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 [17, 72, 82].

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 врачом 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 983 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: Инновационные технологии на: Всероссийской научно-практической конференции «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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Состав микробиоты ротоглотки у человека

Микробиота – это интегральная часть организма человека, динамическая микрoэкологическая система, которую характеризует единство и саморегуляция [3, 7, 19, 20, 26, 79, 83, 84, 85, 87, 109].

Микробиоту условно разделяют на резидентную (по-другому облигатная, индигенная, занимает от общего объема более 50%), добавочную (факультативная, 25-50%) и случайная (транзиторная, менее 25%) [3, 60, 84]. В полости рта обитает примерно 20% микробиоты, в ротоглотке – до 16%, остальная распределяется между другими биотопами организма человека. К облигатной микробиоте относятся лактобациллы и бифидобактерии (в количестве 10^2 - 10^6 КОЕ/мл), α и γ -гемолитические стрептококки в (10^5 - 10^6 КОЕ/мл), нейссерии (10^4 - 10^7 КОЕ/мл). В состав факультативной микробиоты входят коагулазоотрицательные стафилококки, непатогенная гемофильная палочка, некоторые виды коринобактерий (в количестве $\leq 10^4$ КОЕ/мл). К транзиторной микробиоте относят энтеробактерии, псевдомонады, β -гемолитические стрептококки, энтерококки, дрожжеподобные грибы (в количестве 10^2 - 10^3 КОЕ/мл) [3, 60, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 109, 111].

Исследования показывают, что видовой состав микроорганизмов различных локусов разнообразен и развивается постепенно в процессе сукцессии по мере взросления ребенка и заканчивается формированием микробиоценоза взрослого человека. По принципу метаболической интеграции и мутализма осуществляется взаимодействие микробиоты и организма человека [26, 79, 86, 87, 88, 109, 111, 113, 146, 147]. Микробиоценоз опосредованно выполняет некоторые функции организма человека, влияя на его жизнедеятельность и здоровье. Микробиота выполняет три основные функции: метаболическая (поддержание энергетического баланса организма в целом), иммуномодулирующая (участие в формировании иммунитета и его поддержание в состоянии адаптации) и трофическая [135, 138, 139, 140, 146, 147]. От состояния микробиоты зависит

развитие и прогрессирование инфекционного процесса в организме человека [60, 147, 156].

1.2. Этиология острых респираторных заболеваний у детей

Заболевания респираторного тракта различной этиологии у детей, также как и у взрослых, по-прежнему остаются актуальной проблемой как в России, так и во всем мире. Известно, что в структуре заболеваний во всех возрастных группах наибольшая доля приходится на острые респираторные заболевания (ОРЗ), вызываемые вирусно-бактериальными ассоциациями. Респираторные заболевания чисто бактериальной или вирусной этиологии встречаются реже [36, 129, 151]. По официальным статистическим данным, заболеваемость респираторными инфекциями среди детей превышает в 1,5-3 раза заболеваемость у взрослых [45, 61, 64]. Проявление респираторных инфекций характеризуется эпидемическими подъемами и спадами. По отечественным официальным статистическим данным в период подъема заболеваемости уровень госпитализации возрастает в 2-5 раз (2,6% заболевших) по сравнению с периодами спада заболеваемости. Ведущее место в распространении острых респираторных заболеваний занимают вирусы [33, 53].

До недавнего времени первое место в структуре ОРЗ занимала вирусная инфекция гриппа. В 2020 – 2021 годах пандемическое распространение коронавирусной инфекции показало нам существование мощного патогенного потенциала у вирусных респираторных инфекций. В России на ОРВИ приходится более 90% инфекционной заболеваемости [40, 41, 80, 96]. По данным из открытых источников известно, что каждый год около 20 тысяч детей в возрасте до 5 лет госпитализируются из-за осложнений после гриппа [15, 23, 24, 67, 152, 153]. Основной вклад в структуру ОРЗ вирусной этиологии вносят коронавирусы, вирусы гриппа, парагриппа, респираторно-синцитиальный вирус, аденовирусы, риновирусы и некоторые серовары энтеровирусов [121, 122]. Респираторные вирусы наносят наибольший урон здоровью. Особенную опасность имеют осложнения респираторных заболеваний, которые часто возникают после

заражения, и является причиной высокой смертности у пациентов с ослабленным иммунитетом [126, 141]. Многие респираторные вирусы благодаря способности к быстрой мутации делают леченнопрофилактические мероприятия очень сложными [34, 37, 46].

Существующая проблема социально-экономического ущерба от всего комплекса респираторных инфекций, по мнению отечественных исследователей, может быть обусловлена не столько вспышками респираторных инфекций, сколько высокой заболеваемостью ОРВИ в течение всего года, а именно группой риска повторных респираторных инфекций, затрагивающей большую часть городского населения [69].

В литературе представлено много работ, посвященных изучению микробиоты ротоглотки классическим бактериологическим методом, в частности детей, при острых респираторных заболеваниях. На основании многолетних исследований разработаны критерии дисбиоза ротоглотки [2, 60]. У клинически здоровых детей могут быть обнаружены один-два вида условно-патогенной микрофлоры. При выделении представителей транзиторной микробиоты в количествах, превышающих 10^4 КОЕ/мл, а также при полном отсутствии роста микроорганизмов, можно говорить о тяжелых дисбиотических изменениях в микробиоте ротоглотки [2, 3, 7, 11, 60].

При бактериологическом инфекционном процессе в ротоглотке дисбиотические нарушения также приобретают большую клиническую значимость у часто болеющих детей, так как агент, являющийся причиной заболевания, действует длительно или с короткими промежутками, в течение которых микробиота не успевает восстановиться [4, 44, 48].

1.3. Колонизационная резистентность и защитная функция микробиоценоза ротоглотки

Известно, что ротоглотка сложный биотоп, выполняющий ряд жизненно важных функций. Большинство функций связано с защитой организма от инфекций, которые передаются с пищей, воздушно-капельным, контактно-бытовым и воздушно-пылевым путем [55, 75]. Инфекционные

агенты вирусной, бактериальной и грибковой природы попадают на слизистую оболочку полости носа и ротоглотки, а затем проникают в организм через дыхательный или пищевой тракт. Защитные механизмы макроорганизма, частью которых является микробиота, образуют барьер, обеспечивающий многоступенчатую защиту, и действуют как единое целое [108, 150]. Защитой экосистемы слизистых оболочек от патогенных микроорганизмов и вирусов является как колонизационная резистентность [42, 61]. Сведения об основных механизмах колонизационной резистентности имеются в литературе. Физическим барьером для патогенных микроорганизмов и вирусов является кожа и слизистые оболочки.

К факторам колонизационной резистентности можно отнести: 1) движение мукоцилиарного эпителия, 2) скорость обновления мукозального эпителия, 3) напряженность кислорода по толще биопленки. Не маловажную роль в колонизационной резистентности играет 4) антимикробный эффект секретов и рН слюны, а также индигенная микрофлора, которая находится в симбионтных взаимоотношениях с макроорганизмом. Индигенная микрофлора экранирует рецепторы от адгезинов патогенных бактерий и конкурирует с ними за пищевые субстраты [8]. Индигенная микрофлора стимулирует подвижность эпителия, продуцирует антибиотикосхожие вещества, сорбирует ксенобиотики, стимулирует неспецифический иммунный ответ, активирует фагоцитарную и ферментативную деятельность. Также к факторам колонизационной резистентности нормальной микрофлоры можно отнести 5) антагонизм с патогенными микроорганизмами, подавление их жизнедеятельности с помощью продукции бактерицинов и микроцинов, перекиси водорода, мурамидазы, органических кислот и низкомолекулярных метаболитов, а также 6) увлажнение слизистых оболочек слизью и активное механическое удаление патогенных микроорганизмов и вирусов движением слизи [93, 94]. Слизистая оболочка носа за сутки вырабатывает около полулитра жидкости. К неспецифической иммунной защите слизистой относятся следующие факторы: рН, редокс-потенциал, вязкость, низкомолекулярные метаболиты

микрофлоры), а к специфической: sIgA, фагоциты и иммунные клетки. Присутствие sIgA коррелирует с устойчивостью к инфицированности бактериальными, вирусными патогенами и грибами [54, 142].

Микроорганизмы нормальной микрофлоры респираторного тракта регулируют защитные иммунные реакции за счет поддержания Т и В-клеточных иммунных реакций, функции дендритных клеток. Молекулярный механизм противовирусного ответа основан на стимуляции образ-распознающих толл подобных рецепторов (TLR). Известна функция TLR-2 по распознаванию липотейхоевой кислоты и липопротеина бактериальных клеточных стенок, TLR-4 – сенсора липополисахаридов грамотрицательных бактерий и TLR-9 – рецептора, распознающего неметилированную CpG-последовательность бактериальной ДНК. Из исследований Aliprantis A.O. с соавторами [98], которые проводили модельные эксперименты на мышах *in vivo*, следовало, что после подавления нормальной микрофлоры антибиотиками у мышей снижалась устойчивость к заражению вирусом гриппа, а восстановление противовирусного иммунного ответа следовало после введения лигандов TLR. Важную роль в активации противоинфекционной защиты играют NOD-подобные рецепторы (NLR) и инфламмосомы. Появление компонентов клеточных стенок бактерий-комменсалов, например, мурамилпептидов, которые являются лигандами рецепторов NLR существенно усиливает противовирусную защиту [130].

В исследовании Janeway Jr С.А. с соавторами показано, что у пациентов с острой и хронической формой бронхита вирусной, бактериальной природы и микст-инфекции были отмечены достоверные отличия в экспрессии TLR-2 и TLR-4 при бактериальной инфекции и TLR-3 и TLR-4 при вирусной [130].

Ротовая полость представляет собой сложный микробиологический локус из-за ее анатомического строения. Это позволяет говорить о значительном отличии микрофлоры слизистой оболочки ротовой полости, поверхности зубов и десневых карманов [55]. На данный момент известна

информация о более 300 родов бактерий, выделенных из слюны и зубных бляшек [108].

В ротовой полости преобладают *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* и *Bacteroidetes*. Количество видов микроорганизмов на щеках меньше, чем на поверхности зубов [104, 108]. На слизистой оболочке неба встречаются преимущественно аэробные бактерии *Streptococcus spp.*, *Neisseria spp.*, *Corynebacterium spp.* Обособлена от других локализаций биотопа десневая бороздка, что объясняет более богатый видами состав микрофлоры. В десневой бороздке преобладают нитевидные и извитые формы бактерий, реже встречаются бактериоиды, дрожжеподобные грибы, простейшие, микоплазмы. Ротовая жидкость (слюна и жидкость десневой борозды) служат буфером для взаимосвязи между всеми биотопами ротовой полости. Из слюны в большом количестве выделяют *Veillonella spp.*, *Streptococcus spp.*, *Mycoplasma spp.* [104]. Наиболее интенсивнообсемененный локус ротовой полости это – зубная бляшка. В зубном камне содержится наибольшее число видов микроорганизмов в большом титре (от 100 до 300 млн. КОЕ в 1 мг налета) [150]. Строну зубного камня составляют актиномицеты. Их обнаруживают также в протоках слюнных желез [55]. Видовой состав ротовой полости зависит от диеты, гигиены полости рта, заболеваний зубов и верхних дыхательных путей.

В диссертационной работе Метельской В.А. была подтверждена взаимосвязь между заболеваниями пародонта и микробиологическими показателями слизистых ротовой полости [58]. Колонизация полости рта патогенными бактериями может служить риском развития инфекций нижних дыхательных путей, септицемии, эндокардита. Имеются убедительные данные, подтверждающие корреляцию между состоянием микробиоты ротовой полости и системными заболеваниями, ревматоидным артритом, патологией желудочно-кишечного тракта, сердечно-сосудистой системы, онкологией, диабетом [18, 77, 85, 91].

1.4. Особенности функционального состояния микробиоценоза

ротоглотки у часто болеющих детей

Микрофлора ротовой полости человека начинает формироваться внутриутробно и одновременно с развитием желудочно-кишечного тракта [108]. Колонизация микроорганизмами различных полостей организма ребенка до 4 месяцев начинается сразу после его рождения и проходит по двум путям - вертикально (от матери) и горизонтально (из непосредственного окружения). Особенностью микробиоценоза ротоглотки в этой возрастной группе является повышенная продукция микроорганизмами уксусной кислоты, связанная с отсутствием зубных рядов (необходимого условия для существования строгих анаэробов). Литературные данные свидетельствуют, что у детей в возрасте до 4 месяцев в полости рта преобладают аэробные микроорганизмы и факультативные анаэробы *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus spp.*, *Neisseria spp.*, *Haemophilus spp.*, *Candida albicans*, выявляется незначительное количество анаэробов, преимущественно *Veillonella spp.*, *Fusobacterium spp.* [150]. Резкое изменение видового состава микроорганизмов в момент прорезывания зубов и введение прикорма приводит к появлению и быстрому нарастанию количества строгих анаэробов, что соответственно отражается на увеличении доли вырабатываемых ими метаболитов. Появление зубов и изменение анатомического строения ротовой полости приводит также к перераспределению микроорганизмов по новым нишам и снижению протеолитической активности микрофлоры ротоглотки, что отражается на снижении индекса изокислот. С увеличением возраста и изменением питания образуются многочисленные микробные ниши с относительно стабильными микробными популяциями на слизистой оболочке щек, десен, языка, в десневых карманах и на зубах. Эти факторы создают благоприятные условия для адгезии, колонизации и размножения аэробных и анаэробных микроорганизмов, преимущественно стрептококков (*Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans*), лактобацилл (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophylus*, *Lactobacillus salivarius*), грамотрицательных

анаэробных и микроаэрофильных бактерий семейства *Bacteroidaceae* (*B.melaninogenicus* и *B.gingivalis*), *Fusobacterium* и *Propionibacteriaceae*. Количество бактерий родов *Spirochaetales* и *Bacteroides* увеличивается в полости рта примерно к 14 годам, что может быть связано с окончательной сменой зубов, возрастными сдвигами гормонального фона в подростковом возрасте. Все эти факторы активно воздействуют на функциональную активность микробиоты ротоглотки.

Как показано в ряде исследований [18, 25, 27, 48, 70, 73, 92, 128], изменения функциональной активности микробиоценоза ротоглотки связано с периодами становления иммунной системы, продукции IgA и секреции слюнных желез. Концентрация КЖК в слюне значительно ниже, чем в желудочно-кишечном тракте, что связано с меньшим количеством бактерий, небольшим количеством и сроком пребывания пищевых субстратов в ротовой полости. Эволюционно сложившаяся необходимость микробиоты ротовой полости быстро приспосабливаться к резким изменениям температурного режима, рН среды, большому количеству чужеродных бактерий, грибов и вирусов, является причиной высокой дисперсии концентраций КЖК в слюне.

Как отмечалось выше КЖК, продуцируемые микробиотой ротовой полости, играют важную роль в обеспечении нормальной экологии локуса. При достаточном уровне продукции КЖК нормальной микрофлорой образование биопленок потенциально патогенных бактерий практически не происходит [61]. При избыточной продукции КЖК отмечается риск развития пародонтоза [89].

Таким образом, при изучении функциональной активности микробиоценоза ротоглотки, необходимо учитывать физиологические особенности человека в различных возрастных периодах.

Для часто болеющих детей одним из ведущих факторов является присутствие респираторного вируса. Известно, что дефекты нормального метаболического профиля человека и его микробиоценоза связаны с повышенным риском заражения вирусом. В работе J. Munger,

опубликованной в журнале *Nature Biotechnology* в 2008 г. показано, что синтез жирных кислот важен для репликации вирусов, а соотношение метаболитов в клетке может изменяться таким образом, чтобы обозначать метаболические мишени для противовирусной терапии. Вирусы используют метаболическую сеть своих клеточных хозяев, чтобы обеспечить энергию и химические соединения для своей репликации [155]. Авторы публикации описали разработанный ими метод измерения потока, использующий жидкостную хроматографию с тандемной масс-спектрометрией, для количественной оценки изменений метаболической активности, вызванных цитомегаловирусом человека (HCMV). Из полученных результатов был сделан вывод, что благодаря мониторингу кинетики метаболома после внедрения в клетки C-меченых форм глюкозы и глутамина потоки метаболитов в культивируемых клетках млекопитающих имеют разные пути для основной группы и группы сравнения. В основной группе (с инфекцией HCMV) заметно усиливается поток по основному пути метаболизма углерода, включая гликолиз. Фармакологическое ингибирование биосинтеза жирных кислот подавляло репликацию как HCMV, так и гриппа А, другого оболочечного вируса.

У пациентов группы риска повторных респираторных инфекций вероятность заражения вирусной или бактериальной инфекцией значительно возрастает из-за системного нарушения механизмов колонизационной резистентности. У таких пациентов инфекция повторяется многократно, в небольшом промежутке времени, поэтому их называют часто болеющими. Группа часто болеющих пациентов состоит, по большей части, из детей до 14 лет в связи с недостаточным развитием иммунной системы [55, 90].

Для группы риска повторных респираторных инфекций характерны признаки дисбиоза и наличие разрушительных процессов в эпителии. В группе риска повторных респираторных инфекций обнаруживаются существенные нарушения местного секреторного иммунитета. Дефицит sIgA наблюдается при высоких уровнях IgG, а также повышен синтез свободного компонента sc, при этом уровень IgA меньше, чем IgG. Исходя из

вышесказанного, можно отметить, что косвенные признаки антигенного раздражения местного иммунитета присутствуют в условиях его низкой функциональной активности. У группы риска повторных респираторных инфекций выявляется сниженная функциональная активность нейтрофилов, а именно снижен фагоцитарный индекс, индекс переваривания и недостаточная утилизация поглощенных бактерий [18, 27, 28, 48, 49, 73, 90, 92].

Микрофлора ротоглотки у детей группы риска повторных респираторных инфекций в состоянии ремиссии характеризуется отсутствием лактобацилл и бифидобактерий, снижением на 1-2 порядка уровня стрептококков и сапрофитных нейсерий, а также увеличением на 50% частоты обнаружения золотистого стафилококка в титре 3-4 lg КОЕ/г [3, 21, 22, 35, 90]. У большинства пациентов группы риска в 93,6% наблюдается дефицит продукции масляной кислоты. Уксуснокислый тип брожения доминирует за счет подавления маслянокислого типа брожения, что указывает на более интенсивное размножение аэробной микрофлоры и отражается на пониженных значениях структурного индекса. Повышенные значения индекса изокислот, наблюдаемые у 86,2% часто болеющих детей может быть косвенным признаком активации анаэробов, метаболизирующих гликопротеины слизи на фоне деструкции эпителия.

Оценка состояния микробиоценоза ротоглотки по крайним значениям доверительных интервалов интенсивности обсемененности микрофлоры, высеваемой из ротоглотки, и концентрациям иммуноглобулинов в слюне имеет ряд недостатков, основной из которых связан с невозможностью однозначного определения степени микробиологических нарушений. Условия, заданные в учебном пособии [61], имеют несколько одноранговых ограничений, в результате выполнения которых рассматриваемый результат анализа в большинстве случаев не может быть однозначно отнесен к определенной степени микробиологических нарушений. Известно так же, что высеваемость условно-патогенной микрофлоры со слизистой имеет вероятностный характер, что связано с большим количеством

некультивируемых микроорганизмов, или микроорганизмов, требующих создания особых условий культивирования [50, 57]. Результат интенсивности обсеменности микроорганизмами, регистрируемый в бактериологическом анализе, искажает картину реального соотношения микроорганизмов, которая годится для грубой интегральной оценки состояния микробиоценоза ротоглотки.

Оценка метаболической активности микрофлоры ротоглотки указывает на направленность ферментативной активности микробиоценоза в результате сбраживания субстрата полимерного или белкового происхождения [95, 160, 161]. Концентрации метаболитов – короткоцепочечных жирных кислот, зависят от вязкости слюны, а соотношения концентраций могут отражать особенности состава микрофлоры, характерной для различных степеней микробиологических нарушений.

Известно, что оценку микробиологических нарушений микрофлоры ротоглотки можно проводить при помощи математического моделирования состояния метаболома микробиоценоза ротоглотки. Существует метод оценки микробиологических нарушений микробиоценоза ротоглотки при помощи дискриминантного анализа концентраций короткоцепочечных жирных кислот в слюне [30]. Известны классификационные уравнения, по которым определяются степени микробиологических нарушений [32].

Важной характеристикой микробиома является его функциональная активность. Из всех метаболитов, образующихся в результате переваривания субстрата, для решения поставленной в работе задачи, выбор пал на короткоцепочечные жирные кислоты. В кишечнике, например, концентрации короткоцепочечных жирных кислот выше, чем в кале. Это связано с тем, что в кровь всасываются основные количества пропионовой и уксусной кислот, колоноциты эпителия же используют масляную кислоту. Как следствие, концентрации короткоцепочечных жирных кислот в фекалиях зависят от различных факторов, в том числе от индивидуальных особенностей человека, и отличаются большим разбросом значений. Функциональная активность микрофлоры характеризуется суммарной

концентрацией кислот, концентрацией масляной кислоты, отношением суммы валериановой, капроновой, пропионовой, масляной кислот и их изомеров к концентрации уксусной кислоты (структурный индекс) и отношением суммы концентраций изокислот к концентрациям их линейных форм для валериановой, масляной и капроновой кислот (индекс изокислот). Соотношение концентраций масляной, уксусной, и пропионовой кислот указывает на целостность микробного сообщества и симбиотический тип взаимодействия макроорганизма и микробиоты [95].

1.5. Роль микробиом-ассоциированной метаболомики в предиктивной диагностике заболеваний

Использование омик-технологий позволяет расширить возможности диагностики за счет использования информационного потенциала сложных живых систем. К омик-технологиям относятся направления системной биологии геномика, транскриптомика, протеомика, метаболомика и многие другие «омики», которые начали существование полвека назад, но продолжают стремительно развиваться и дополняться новыми разделами в течение последнего десятилетия. Первым упоминанием о метаболомике можно считать предположение, высказанное в 1971 году Linus Pauling с соавторами, в котором говорилось, что в качественном и количественном (видовом) составе биологических жидкостей организма заложена информация о его функциональном состоянии. Методом газовой хроматографии они анализировали выдыхаемый пациентом воздух в целях выявления метаболических изменений при определённых заболеваниях, и выявили более 200 различных летучих органических соединений [163]. В 1999 году Nicholson J.K. с соавторами предложил механизм извлечения информации о функциональном состоянии организма и применил многофакторный анализ для интегральной оценки состояния биологического объекта [157]. Также он ввел понятие «метабономика» - это научное направление, которое занимается исследованием низкомолекулярных соединений (конечные и промежуточные продукты обмена веществ в

биологической системе - клетке, органе или организме в целом). В настоящее время чаще используется понятие «метаболомика».

Метаболомика изучает ответ организма на патофизиологическое воздействие: болезнь, действие лекарственных препаратов, окружающая среда. Для сохранения постоянства всего внутреннего состояния системы, после какого-либо воздействия на организм, концентрации различных метаболитов изменяются, однако внутриклеточные и внеклеточные метаболиты находятся в состоянии динамического равновесия. Поэтому клеточный ответ будет отражен в изменяющемся составе биологических жидкостей организма. Если проанализировать полученные наборы метаболитов, то можно установить своеобразный «отпечаток» (fingerprint), который будет отражать физиологическое состояние организма [101]. Новая технология анализа реакции живых систем на патофизиологические воздействия, которая выражается в количественном измерении динамического мультипараметрического метаболического ответа, начала активное развитие с начала 2000-х годов [38].

Для изучения наборов метаболитов в качестве исследуемых образцов чаще всего используются сыворотка крови, моча, мокрота [43]. Наиболее популярным методом исследования в метаболомике является ЯМР-спектметрия. Это метод неразрушающего анализа, поэтому он применяется для исследования процессов, происходящих непосредственно в живых клетках действующих органов. Масс-спектрометрию самостоятельно или в сочетании с газовой, жидкостной хроматографией, капиллярным электрофорезом можно считать вторым по популярности методом исследования. Они используются для изучения биологических жидкостей. Исследование метаболома - одно из самых передовых и перспективных направлений, что делает его популярным в различных областях медицинской и биологической наук.

Известны примеры применения метаболомных исследований в области психиатрии. Метаболомика позволяет установить биомаркеры психических заболеваний, критерии его развития и эффективности терапии [136].

Например, по результатам метаболомного исследования у больных паркинсонизмом был выявлен повышенный уровень глутатиона и пониженный уровень мочевой кислоты в крови [107]. Повышенный в крови уровень гамма-аминомасляной кислоты и пониженный уровень глюкозы – являются маркерами болезни Баттена [164]. При метаболомном исследовании сыворотки крови и мочи больного шизофренией установлены маркеры этого заболевания – определенные концентрации жирных кислот и кетонных тел (цистин, глицериновая, эйкозеновая, бета-оксимасляная, пировиноградная кислоты) [176]. Для болезни Альцгеймера маркерами заболевания выступают определенные уровни норадреналина и связанных с ним метаболитов [137].

Известно успешное применение исследований метаболома в кардиологии. Ранняя диагностика повреждений миокарда существенно снижает смертность. Исследования показали, что у пациентов с признаками ишемической болезни установлены определенные уровни гамма-аминомасляной кислоты, мочевой и лимонной кислоты, так же гипоксантина, триметиламин-N-оксида и аконитовой кислоты [143, 144, 145].

На метаболомику возлагают большие надежды в поиске биомаркеров в первую очередь онкологических заболеваний.

Метаболомный анализ в гинекологии используют для изучения этиологии, патогенеза и обнаружения биомаркеров эндометриоза, синдрома поликистозных яичников, идентификация маркеров в онкогинекологии (рак шейки матки, яичника). Например, при эндометриозе установлены повышенные уровни фосфатидилхолина и сфингомиелина в плазме [170]. При синдроме поликистозных яичников изменяются концентрации метаболитов: аргинина, лизина, орнитина, пролина, глутамата, ацетона, цитрата и гистидина [100]. Диагностика и лечение рака молочной железы – это пример успешного применения метаболомики в онкологии, когда устанавливают повышенный уровень глицерофосфохолина и глюкозы с помощью ЯМР-спектromетрии (исследование метаболитического профиля *in vivo*) [123, 168].

На основе данных газовой хроматографии и ЯМР-спектроскопии Sreekumar с соавторами различает три состояния предстательной железы: доброкачественные заболевания, ограниченная и распространенная форма рака предстательной железы. Концентрация метаболита саркозина была существенно увеличена на этапе метастатического прогрессирования рака предстательной железы [169].

На основании результатов хромато-масс-спектрометрии создана модель ранней диагностики колоректального рака (альфа-оксимасляная, кинуреновая, аспаргиновая кислоты, цистамина) [158]. Как установили Cheng Y. и его соавторы диагностика колоректального рака возможна также по продуктам совместного метаболизма организма и микробиоты кишечника (лимонная, гиппуровая, 2-аминомасляная, миристиновая и кинуреновая кислоты, пара-крезол и путресцин) [112].

Хуе с соавторами установили, что группа больных раком печени и контрольная группа различались по 19 летучим органическим соединениям в крови. В крови группы больных раком печени гексанал, 1-октен-3-ол и октан были найдены в повышенных концентрациях [175].

Изменение метаболического профиля холин-содержащих соединений и N-ацетиласпартата, исследуемых МРТ и ЯМР-спектроскопией, характеризует такое заболевание как рак головного мозга [117].

Goeminne с соавторами определяли летучие органические соединения, вырабатываемые *Pseudomonas aeruginosa*, в мокроте больных муковисцидозом легких. Они установили взаимосвязь между присутствием в организме пациента *Pseudomonas aeruginosa* и высокой концентрацией в образцах мокроты терпенов и соединений додекана [124].

Изучение метаболитов микробного происхождения является отличительной чертой применения метаболомики в гастроэнтерологии. Кишечник человека содержит большое количество метаболитов, которые продуцирует кишечная микрофлора. Между организмом человека и микробиотой установлена метаболическая интеграция, за счет которой организм получает основные метаболиты для выполнения ряда функций,

например, для поддержания энергетического баланса организма [103, 156, 165]. В ряде публикаций утверждается, что метаболическая активность микробиоты кишечника определяет уровень ряда низкомолекулярных метаболитов в крови, например, некоторых карбоновых кислот [12, 13, 159]. Особый интерес представляют исследования метаболома микрофлоры при воспалительных заболеваниях кишечника [118].

Также для описания метаболических исследований используются термины «метаболическое» и «биохимическое профилирование». Метаболическое профилирование - это способ определения состава и количества малых молекул в биологическом образце. Анализ проводится с применением технологических приемов, например ядерный магнитный резонанс, масс-спектрометрия, капиллярный электрофорез, газовая хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография. Наиболее эффективный способ для извлечения информации о метаболитах заключается в изучении результатов ЯМР-спектрометрии исследуемой биологической жидкости (системы) с применением многомерной статистики. Широко используются метод главных компонент и факторный анализ, которые позволяют определить направленность изменений в системе и количество степеней свободы. Создаются карты главных компонент, которые визуально отражают поведение исследуемой системы под влиянием какого-либо фактора. «Рисунок» ЯМР-спектра системы определен его метаболическим профилем [110, 132, 171]. На данном этапе для научных исследований это популярный и простой подход. Для изучения биохимических процессов *in vivo* все намного сложнее, потому что процессы, вызванные различными факторами, развиваются в режиме реального времени. Для решения таких многофакторных задач разработаны автоматические методы классификации метаболомных данных на основе математического моделирования [115, 116]. Построив полный ряд моделей можно спланировать классификацию для широкого диапазона образцов биологических объектов [120].

Популярным инструментом для изучения высоколинейных и зашумленных данных является простой в применении линейный

дискриминантный анализ (ЛДА). Популярность этой методики связана с широкой доступностью ЛДА в большинстве статистических программных пакетов, с простым и понятным алгоритмом работы. В статистических программных пакетах есть возможность оценить точность прогнозирования, увидеть графики [125].

1.6. Использование линейного дискриминантного анализа в микробиом-ассоциированной метаболомике

Дискриминантный анализ предназначен для расчета линейной комбинации показателей, используя которую возможно отличать объекты разных классов. Такой подход к разделению по классам позволяет определить наиболее информативные показатели рассчитываемой модели, точность классификации, статистическую значимость параметров и их факторную нагрузку.

В результате математического моделирования рассчитываются комбинации линейных уравнений, составляющих правила для расположения исследуемых объектов в дискриминантном пространстве различной размерности. Также рассчитываются средние величины по группам, называемые центроидами, и классификационные уравнения, которые представляют собой гиперплоскость для разделения областей значения дискриминантных функций исследуемых групп. Динамика заболевания может быть оценена по изменению расстояний между точками (например, до и после лечения) в дискриминантном пространстве, которое измеряется по правилам Евклидовой геометрии и называется расстоянием Махаланобиса [52, 148].

Включение изучаемых показателей в первичную модель связано с ограничениями, предотвращающими искажение результатов математического моделирования. Это скоррелированные данные и данные с высокой толерантностью. Толерантность оценивается по критерию лямбда Уилкса, который указывает на отношение внутригрупповой изменчивости данных к их общей изменчивости. После построения модели наименьшее

значение частной лямбда Уилкса указывает на высокую значимость признака в дискриминации групп.

Критерием для исключения компонентов из модели является высокое значение толерантности. Толерантность указывает на степень избыточности признака. Наибольшая толерантность используется для маркировки кандидата для исключения компонента из модели при ее построении [17].

Модель считается оптимальной, если все компоненты имеют достаточно низкий уровень толерантности, а их статистическая значимость $p < 0,05$. Полученная дискриминантная функция (функции) с координатой (координатами) центроидов позволяет определить оптимальное соотношение изучаемых компонентов для исследуемой патологии. Классификационные уравнения являются диагностическими коэффициентами исследуемой патологии и записываются в виде двух и более линейных уравнений.

Для постановки предиктивного диагноза пациента в классификационные уравнения подставляют соответствующие ему значения компонентов и получают значения диагностических коэффициентов. Максимальное значение диагностического коэффициента определяет предиктивный диагноз пациента. Количество ложноположительных, ложноотрицательных, истинно положительных и истинно отрицательных измерений служат для расчета прогностических свойств модели.

Микробиом-ассоциированная метаболомика позволяет в полной мере задействовать информационный потенциал микробиоты для диагностики заболеваний и выявления групп риска. Реакция микробиоты на факторы экзогенного и эндогенного происхождения обеспечивается ее более разнообразным совокупным геномом и соизмеримым количеством клеток микроорганизмов по сравнению с макроорганизмом. За счет социального поведения микроорганизмов в микробиоме, возможности горизонтального переноса генов, микробиоту можно использовать в качестве высокочувствительного сенсора заболевания. Исследование микробиоты методами ОМИК-технологий дополняет современные методы диагностики и прогноза развития заболеваний.

Заключение по главе

Анализ литературных источников по данной тематике в рецензируемых изданиях, в том числе и зарубежных, показывает, что диагностика инфекционных заболеваний методами реактивной медицины достигла уровня, когда усложнение и модификация диагностики и лечения не дает ожидаемого эффекта. Новые подходы, заявляемые в персонифицированной медицине, которые основываются на системной интегральной оценке макроорганизма и его микробиоты как единого биологического объекта, имеют широкие перспективы и успешно применяются в реализации задач как научных исследований, так и в практике здравоохранения.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 2. Функциональная активность микробиоценоза ротоглотки у людей

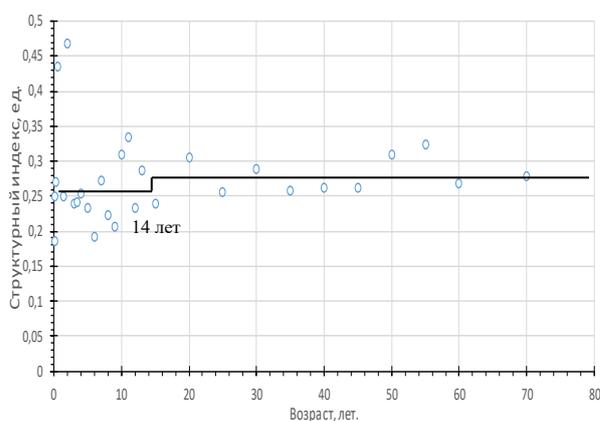
2.1. Оценка функциональной активности микробиоценоза ротоглотки у людей в разных возрастных группах

Микробиота ротовой полости человека формируется внутриутробно и одновременно с развитием желудочно-кишечного тракта [108]. Колонизация микроорганизмами различных полостей организма ребенка начинается сразу после его рождения [150]. Резкое изменение состава микрофлоры ротовой полости происходит в момент прорезывания зубов и введения прикорма. Это также приводит к перераспределению микроорганизмов по новым нишам (слизистая оболочка десен, щек, языка, десневые карманы и зубной камень). К 14 годам происходит окончательная смена зубов, изменяется гормональный фон подростка. Все эти факторы активно воздействуют на функциональную активность микробиоты ротоглотки. Также на функциональное состояние микробиоценоза ротоглотки влияют экзогенные факторы - резкие изменения температуры, рН, инвазии вирусов, чужеродных грибов и бактерий, что является причиной большого разброса концентраций метаболитов в слюне [31].

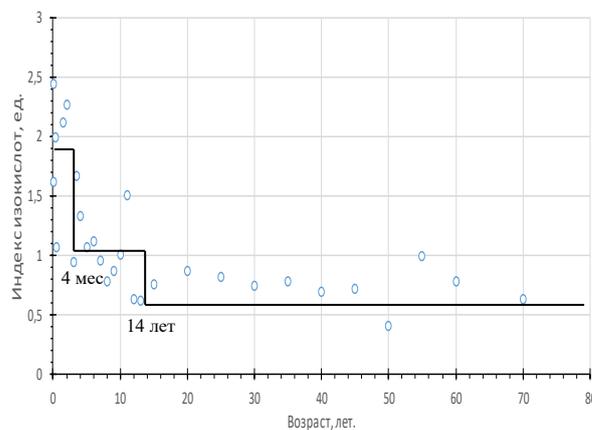
Для определения возрастных периодов, в которых концентрации короткоцепочечных жирных кислот (уксусная, пропионовая, изомасляная, масляная, изовалериановая, валериановая, изокапроновая, капроновая) могут изучаться без учета возрастных изменений, был проведен бактериологический анализ мазков из ротоглотки пациентов. 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 α-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.

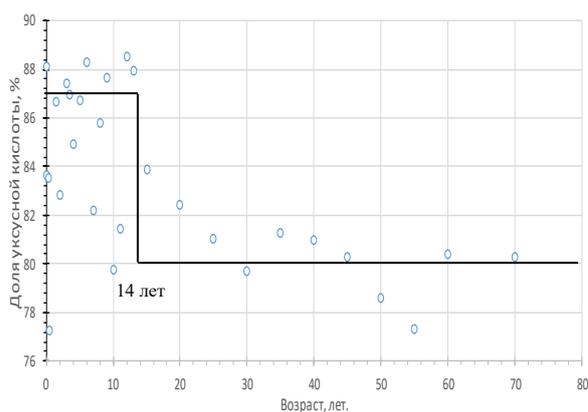
Результаты определения абсолютных и относительных концентраций КЖК в слюне были ранжированы по возрасту (всего 683 пациента в возрасте от 1 мес до 85 лет, гендерные различия не учитывались) (Рисунок 3).



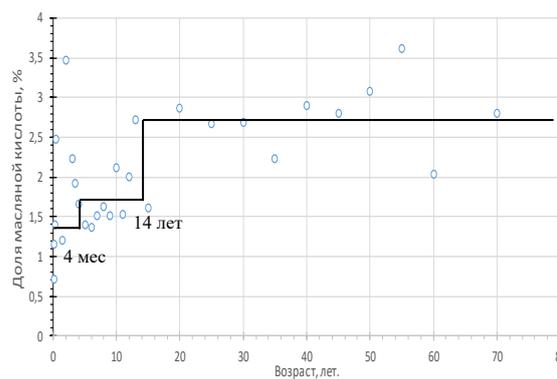
а) структурный индекс



б) индекс изокислот



в) доля уксусной кислоты, %



г) доля масляной кислоты, %

Рисунок 3 – Зависимость показателей интегральной оценки микробиоценоза ротоглотки от возраста пациента

Для пациентов в возрасте до 5 лет временные промежутки с однородными значениями показателей были определены путем выявления постоянных тенденций средних (медианных) значений, усредненных для пациентов одного возраста с точностью до месяца. Для пациентов старше 5 лет - с точностью до 1 года. Для каждой группы по каждому изучаемому показателю рассчитывалось среднее медианное значение. Эти значения

нанесли на графики в соответствии с возрастом. Графики основных показателей функциональной активности микробиоценоза ротоглотки - структурного индекса (Рисунок 3а), индекса изокислот (Рисунок 3б), доли уксусной кислоты (Рисунок 3в) и доли масляной кислоты (Рисунок 3г).

В результате анализа графиков были выделены области, в которых по медианным значениям можно определить тенденцию изменения и определенный уровень исследуемого показателя. Далее каждую последующую область сравнивали с предыдущей по U-критерию Манна-Уитни с порогом значимости 95% ($p < 0,05$). Если показатель был $p > 0,05$ - временные интервалы объединяли и рассматривали как один временной интервал. Описательная статистика по показателям абсолютных концентраций КЖК и их расчетных индексов представлена в таблице 2 в виде среднего (медианного значения), нижнего-верхнего квартилей (интерквартильного разброса), стандартного отклонения, стандартной ошибки и дисперсии.

Результаты абсолютных и относительных концентраций компонентов КЖК в слюне представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Показатели абсолютных и относительных концентраций компонентов КЖК в слюне у пациентов различных возрастных групп

Возраст	Кол-во исследованных	Среднее значение (интерквартильный разброс)	Дисперсия	Стандартная ошибка среднего	Стандартное отклонение
Абсолютные концентрации компонентов КЖК в слюне, ммоль/г					
Уксусная кислота					
0 - 85 лет	683	6,27 (3,79 - 11,21)	137,91	0,46	11,74
Абсолютные концентрации компонентов КЖК в слюне, ммоль/г					
Уксусная кислота					
0 - 85 лет	683	6,27 (3,79 - 11,21)	137,91	0,46	11,74
Пропионовая кислота					
0 - 13 лет	392	0,91 (0,42 - 1,77)	11,42	0,18	3,38
14 - 85 лет	291	1,19 (0,7 - 2,2)	5,68	0,15	2,38
Изомасляная кислота					
0 - 13 лет	392	0,13 (0,08 - 0,25)	0,42	0,03	0,65
14 - 85 лет	291	0,07 (0,03 - 0,17)	0,07	0,02	0,27

Продолжение таблицы 2

Возраст	Кол-во исследований	Среднее значение (интерквартильный разброс)	Дисперсия	Стандартная ошибка среднего	Стандартное отклонение
Масляная кислота					
0 – 13 лет	392	0,1 (0,06 - 0,24)	0,49	0,04	0,7
14 - 85 лет	291	0,22 (0,1 - 0,5)	0,96	0,06	0,98
Изовалериновая кислота					
0 - 13 лет	392	0,09 (0,05 - 0,16)	0,12	0,02	0,35
14 - 85 лет	291	0,07 (0,03 - 0,17)	0,03	0,01	0,18
Валериновая кислота					
0 - 13 лет	392	0,07 (0,03 - 0,17)	0,2	0,02	0,45
14 - 85 лет	291	0,01 (0 - 0,04)	0,02	0,01	0,12
Изокапроновая кислота					
0 - 13 лет	392	0,03 (0,01 - 0,1)	0,22	0,02	0,47
14 - 85 лет	291	0 (0 - 0,01)	0,002	0,002	0,04
Капроновая кислота					
0 - 13 лет	392	0,02 (0,01 - 0,04)	0,02	0,01	0,15
14 - 85 лет	291	0 (0 - 0,01)	0,001	0,002	0,03
Относительные концентрации компонентов КЖК в слюне, %					
Уксусная кислота					
0 - 13 лет	392	79,99 (73,97 - 85,05)	83,7	0,47	9,15
14 - 85 лет	291	78,55 (72,23 - 83,71)	95,75	0,6	9,79
Пропионовая кислота					
0 - 13 лет	392	10,78 (7,62 - 15,65)	38,18	0,32	6,18
14 - 85 лет	291	15,63 (11,45 - 19,27)	34,21	0,36	5,85
Изомасляная кислота					
0 - 13 лет	392	1,61 (1,04 - 3,14)	3,82	0,1	1,95
14 - 85 лет	291	0,94 (0,52 - 1,65)	2,15	0,09	1,47
Масляная кислота					
0 - 13 лет	372	1,56 (0,99 - 2,54)	14,07	0,19	3,75
14 - 85 лет	269	2,71 (1,51 - 4,75)	26,71	0,32	5,17
Изовалериновая кислота					
0 - 13 лет	372	1,09 (0,7 - 1,75)	1,89	0,07	1,38
14 - 85 лет	269	0,92 (0,45 - 1,43)	1,12	0,06	1,06
Валериновая кислота					
0 - 13 лет	372	0,93 (0,35 - 2,04)	6,89	0,14	2,63
14 - 85 лет	269	0,11 (0,05 - 0,44)	2,35	0,09	1,53
Изокапроновая кислота					
0 - 13 лет	372	0,35 (0,14 - 1,27)	2,99	0,09	1,73
14 - 85 лет	269	0,05 (0,03 - 0,09)	0,48	0,04	0,69
Капроновая кислота					
0 - 13 лет	372	0,29 (0,13 - 0,62)	0,24	0,03	0,49
14 - 85 лет	269	0,05 (0,03 - 0,08)	0,45	0,04	0,67
Общий уровень (суммарная концентрация абсолютных показателей), ммоль/г					
0 - 85 лет	683	8,038 (4,85 - 14,22)	242,51	0,615	15,57

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

Результаты исследований показали (Таблица 2), что абсолютные концентрации КЖК в слюне всех пациентов, включенных в исследование, имеют высокую дисперсию, что связано с зависимостью абсолютных концентраций КЖК от активности секреции слюнных желез. Поэтому суммарная абсолютная концентрация КЖК не имеет достоверных различий для всех временных интервалов. Среднее (медианное) значение 8,038 ммоль/г с разбросом от 4,85 до 14,22 ммоль/г характерно для всей исследуемой выборки. Абсолютная концентрация уксусной кислоты в слюне также, как и суммарная концентрация КЖК, имеет высокую дисперсию и большой разброс значений, который не имеет достоверных отличий на всех временных интервалах. Среднее значение абсолютной концентрации уксусной кислоты 6,27 ммоль/г, интерквартильный разброс 3,79 – 11,21 ммоль/г. Для абсолютных концентраций пропионовой, масляной, валериановой, капроновой КЖК и их изомеров выделяются по два статистически значимо отличающихся возрастных интервала от 0 до 14 лет и от 14 лет до 85 лет, в связи с более низкой дисперсией значений. Абсолютная концентрация пропионовой кислоты в слюне увеличивается в 1,3 раза для интервала старше 14 лет, по сравнению с интервалом от 0 до 14 лет. Абсолютная концентрация масляной кислоты в слюне увеличивается в 2 раза. Абсолютные концентрации изокилот, валериановой и капроновой кислот снижаются при переходе к возрастной группе пациентов старше 14 лет: изомаляная кислота снижается в 1,77 раза, изовалериановая - в 1,13 раза, изокапроновая - в 5 раз, валериановая - в 12,7 раза, капроновая - в 4,4 раза. Высокая кратность валериановой, капроновой и изокапроновой кислот связана с низким исходным значением абсолютных концентраций данных КЖК в интервале от 0 до 14 лет.

Относительные концентрации уксусной, изомаляной, изовалериановой, валериановой, изокапроновой и капроновой кислот снижаются в 14 лет, а относительные концентрации пропионовой и масляной кислот повышаются. Снижение составляет для относительных концентраций уксусной кислоты — в 1,1 раза; изомаляной — 1,7 раза; изовалериановой —

1,06 раза; валериановой — 8,7 раза для изокапроновой и капроновой — 6 раз. Увеличение относительной концентрации пропионовой кислоты составляет 1,5 раза; масляной — в 1,7 раза.

В установленных возрастных группах, в рамках которых показатели функциональной активности микробиоценоза ротоглотки остаются неизменными, проанализированы результаты бактериологического анализа мазков из ротоглотки. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 - 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 (Хи-квадрат); ** - отмечено статистически значимое отличие между группой «4 месяца – 14 лет» и группой «старше 14 лет», рассчитанно по критерию согласия Пирсона (Хи-квадрат), $p < 0,05$

Результаты исследований, представленные в таблице 3, 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.

Учитывая, что разные компоненты КЖК в слюне продуцируются различными видами микроорганизмов, отличающихся по типу питания (сахаролитическое – протеолитическое) и типу дыхания (аэробное –

анаэробное), соотношения концентраций КЖК можно использовать для интегральной оценки функциональной активности микрофлоры ротоглотки [11, 12]. Одним из интегральных показателей является структурный индекс, характеризующий активность анаэробной (индигенной) микрофлоры [31]. Он рассчитывается как отношение суммы пропионовой, масляной, валериановой, капроновой кислот и их изомеров (изопропионовой, изомасляной, изовалериановой, изокапроновой кислот) к концентрации уксусной кислоты. Индекс изокилот, характеризующий протеолитическую активность микробиоценоза ротоглотки, рассчитывается как отношение суммы изомасляной, изовалериановой и изокапроновой кислот к сумме масляной, валериановой и капроновой кислот. Соотношение уксусной, пропионовой, масляной кислот является важным индикатором целостности микробного сообщества. При симбионтных отношениях микроорганизмов индигенной микрофлоры в микробно-тканевом комплексе, соотношение перечисленных метаболитов сохраняет постоянство в узком диапазоне концентраций КЖК [30].

Результаты расчетных индексов и соотношений концентраций компонентов КЖК в слюне представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Расчетные индексы и соотношения КЖК в слюне у пациентов различных возрастных групп

Возраст	Кол-во исследований	Среднее значение (интерквартильный разброс)	Дисперсия	Стандартная ошибка среднего	Стандартное отклонение
Структурный индекс, ед.					
0 – 13 лет	392	0,25 (0,18 - 0,35)	0,05	0,01	0,22
14 - 85 лет	291	0,27 (0,19 - 0,38)	0,11	0,02	0,33
Индекс изокилот, ед.					
0 – 3 мес	82	1,89 (1,25 - 2,42)	2,35	0,18	1,53
4 мес - 13 лет	310	1,04 (0,64- 1,85)	1,62	1,27	0,07
14 - 85 лет	291	0,74 (0,40 -1,03)	1,14	0,07	1,07

Продолжение таблицы 4

Возраст	Кол-во исследований	Среднее значение (интерквартильный разброс)	Дисперсия	Стандартная ошибка среднего	Стандартное отклонение
Доля компонента КЖК в сумме уксусной:пропионовой:масляной кислот, %					
Уксусная кислота					
0 - 13 лет	392	86,59 (80,92 - 89,58)	61,13	0,41	7,82
14 - 85 лет	291	80,3 (75,37 - 85,73)	74,95	0,53	8,66
Пропионовая кислота					
0 – 3 мес	82	12,46 (9,66 - 17,6)	58,4	0,89	7,64
4 мес - 13 лет	310	11,25 (7,93 - 16,16)	38,23	0,36	6,18
14 - 85 лет	291	16,09 (11,81 - 19,81)	40,89	0,39	6,39
Масляная кислота					
0 – 3 мес	82	1,4 (0,62 - 2,24)	4,15	0,24	2,04
4 мес - 13 лет	310	1,72 (1,1 - 2,83)	18,84	0,25	4,34
14 - 85 лет	291	2,73 (1,54 - 4,9)	30,28	0,34	5,5

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, представленные в таблице 4, показали, что структурный индекс увеличивается в 14 лет в 1,1 раза, что объясняется снижением доли уксусной кислоты, так как структурный индекс и доля уксусной кислоты обратно пропорциональны.

Индекс изокилот снижается в 4 месяца в 1,7 раза, а в 14 лет в 2,4 раза. Индекс изокилот отражает протеолитическую активность микробиоценоза. Снижение индекса изокилот указывает на снижение протеолитической активности микробиоценоза с возрастом.

Соотношение уксусной, пропионовой и масляной кислот имеет 3 временных интервала, для которых средние значения постоянны: от 0 до 4 месяцев; от 4 месяцев до 14 лет; от 14 лет и старше.

Доля уксусной кислоты изменяется только в двух интервалах: от 0 до 14 лет и старше 14 лет, а пропионовая и масляная в трех интервалах: от 0 до 4 месяцев; от 4 месяцев до 14 лет; от 14 лет и старше. Доля уксусной кислоты у людей старше 14 лет снижается в 1,1 раза, что указывает на увеличение доли

анаэробной микрофлоры в микробиоценозе ротоглотки. Доля пропионовой кислоты в 4 месяца незначительно (в 1,1 раза) снижается, а в 14 лет увеличивается в 1,5 раза. Доля масляной кислоты с возрастом увеличивается в 4 месяца в 1,2 раза, а в 14 лет в 1,6 раза.

Таким образом, для трех различных возрастных групп (0-4 мес., 4 мес – 14 лет, 14-85 лет) характерны различные концентрации КЖК, их относительное содержание и структурный индекс, отражающие функциональную активность микробиоценоза ротоглотки. Для показателей регистрируется 2-3 возрастных этапа изменений функциональной активности микробиоценоза ротоглотки. Стабильная структура функциональной активности микробиоценоза ротоглотки устанавливается в 14 лет. После 14 лет функциональная активность микробиоценоза ротоглотки не изменяется. Микробиологический состав микробиоценоза ротоглотки в установленных трех возрастных группах согласуется с физиологическими особенностями этого биотопа в соответствующем возрасте.

Установлено, что суммарная концентрация КЖК и концентрация уксусной кислоты в слюне имеют высокий разброс значений, что не позволяет разделить их концентрации на возрастные интервалы. Полученные данные свидетельствуют о том, что структурный индекс и индекс изокислот являются наиболее чувствительными к изменениям структуры микробиоты.

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

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

Острые респираторные заболевания верхних дыхательных путей, а также осложнения в виде бронхитов и пневмоний, остаются самой распространенной патологией человека. Особенно уязвимой возрастной группой являются дети. На их долю приходится до 40% случаев заболевания внебольничной пневмонией. Среди детей особенно уязвимы к респираторным инфекциям часто болеющие дети. На их долю приходится до 80% заболеваний острыми респираторными вирусными инфекциями. В связи с этим для дальнейшего изучения микробиоценоза ротоглотки были выбраны дети в возрасте от 4 месяцев до 14 лет.

Функциональная активность микробиоценоза ротоглотки характеризует метаболическую активность связанных в сообщество микроорганизмов, которые функционируют как единое целое. Известно, что микробиоценоз человека представляет из себя единую экосистему - целостный метаболический орган. Микробиоценозы различных локусов взаимосвязаны друг с другом и на их метаболическую активность влияют различные факторы (пища, стресс, pH и другие), в связи с чем, члены этих микробных сообществ могут в ответ на изменения в организме адаптировать свои метаболические функции [3, 6, 7, 11, 56, 78, 99, 105, 135]. Например, углеводные субстраты используются в случае их избытка, в противном случае ферментируются гликопротеины слизи [105, 135, 138, 139, 147]. Также установлено, что даже далекие друг от друга виды бактерий могут выполнять сходные метаболические функции [127, 147]. С целью поддержания стабильности функциональной активности микробного сообщества микроорганизмы могут осуществлять синтез необходимых метаболитов различными путями [105, 147].

Для характеристики функциональной активности микробиоценоза ротоглотки у детей рассчитывали референсные значения концентраций КЖК в слюне и их расчетных индексов при состоянии микробиоценоза ротоглотки

в норме и при выявленных дисбиотических нарушениях. Для сравнения критериев функциональной активности микробиоценоза ротоглотки использовали простую описательную непараметрическую статистику. Для вычисления референсных значений использовали бинарную логистическую регрессию – ROC-анализ. С помощью ROC-анализа определяли качественные характеристики логистической регрессии при рассчитанных референсных значениях, что позволило выбрать наиболее информативные критерии функциональной активности микробиоценоза ротоглотки.

В исследование был включен 151 ребенок в возрасте от 4 месяцев до 14 лет. Гендерные различия не учитывались. Пациенты распределены на две исследовательские группы. В основную группу включены пациенты (87 человек), у которых в бактериологическом анализе мазка из ротоглотки условно-патогенная микрофлора определялась в количестве более 6 lg КОЕ/г. Группа сравнения (64 человека), была сформирована из пациентов, в бактериологическом анализе мазка которых интенсивность обсемененности ротоглотки условно-патогенной микрофлорой не превышала 6 lg КОЕ/г [61]. Сравнивали результаты исследований, полученные у пациентов двух исследовательских групп.

В исследуемых группах пациентов проанализированы результаты бактериологического анализа мазков из ротоглотки. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5 - 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

Продолжение таблицы 5

Микроорганизмы	Основная группа, частота встречаемости, %; (интенсивность обсемененности, lg КОЕ/г)	Группа сравнения, частота встречаемости, %; (интенсивность обсемененности, lg КОЕ/г)
<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), $p < 0,05$

Результаты исследований, представленные в таблице 5, показали, что в основной группе выше разнообразие микроорганизмов и выше общее микробное число, что было задано условиями отбора в основную группу. В основной группе статистически значимо 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 высеваются представители нормальной микрофлоры ротоглотки: *Streptococcus γ-hem+*, *Neisseria spp.*, *Staphylococcus spp.*

Таким образом, в основной группе отмечается более высокое биоразнообразие и более высокие значения интенсивности обсемененности микроорганизмами.

Далее мы анализировали концентрации короткоцепочечных жирных кислот, рассчитывали структурный индекс, индекс изокилот, суммарную концентрацию и относительные концентрации КЖК в слюне пациентов.

Полученные выборки для исследуемых групп оценивали на наличие нормального распределения по критерию Шапиро-Уилка. В связи с отсутствием нормального распределения, для выявления статистически значимых различий использовали U-критерий Манна-Уитни.

Результаты анализа по определению концентраций КЖК в слюне пациентов основной группы и группы сравнения представлены в таблице 6. В качестве средних использовали медианные значения, для оценки разброса использовали интерквартильный разброс.

Таблица 6 – Показатели функциональной активности микробиоценоза ротоглотки у пациентов

Параметр	Значения параметров функциональной активности микробиоценоза ротоглотки в группах	
	Основная группа	Группа сравнения
Интегральные критерии функциональной активности		
Общий уровень, ммоль/г	72,17 [16,61 - 94,7]	66,35 [22,08 - 87,62]
Структурный индекс, ед.	0,3 [0,24 - 0,37]*	0,55 [0,49 - 0,7]
Индекс изокилот, ед.	1,01 [0,73 - 1,34]	1,02 [0,64 - 1,37]
Относительные концентрации КЖК в слюне, ед.		
Уксусная	0,77 [0,73 - 0,81]*	0,65 [0,59 - 0,67]
Пропионовая	0,18 [0,14 - 0,22]*	0,27 [0,24 - 0,3]
Изомасляная	0,01 [0,01 - 0,02]*	0,02 [0,01 - 0,03]
Масляная	0,02 [0,01 - 0,03]*	0,03 [0,02 - 0,04]
Изовалериановая	0,01 [0 - 0,01]*	0,01 [0,01 - 0,02]
Валериановая	0,001 [0,001 - 0,002]	0,001 [0,001 - 0,002]
Изокапроновая	0,001 [0 - 0,001]	0 [0 - 0,001]
Капроновая	0 [0 - 0,001]	0 [0 - 0,001]

*Примечание: * - отмечены значения, указывающие на статистически значимое отличие групп друг от друга, рассчитанно по U-критерию Манна-Уитни, $p < 0,05$*

В таблице 6 показано, что относительные концентрации КЖК в слюне у пациентов основной группы ниже, чем в группе сравнения. Значение структурного индекса в основной группе в 1,8 раза ниже, чем в группе сравнения. Концентрация уксусной кислоты статистически значимо выше в 1,2 раза, чем в группе сравнения.

Таким образом, из данных, представленных в таблице 6 можно заключить, что в основной группе отмечается снижение структурного индекса и большинства относительных концентраций КЖК, продуцируемых анаэробной микрофлорой. Угнетение анаэробной микрофлоры – это угнетение нормальной индигенной микрофлоры, а увеличение концентрации

уксусной кислоты указывает на увеличение количества аэробной, просветной микрофлоры в микробиоценозе ротоглотки.

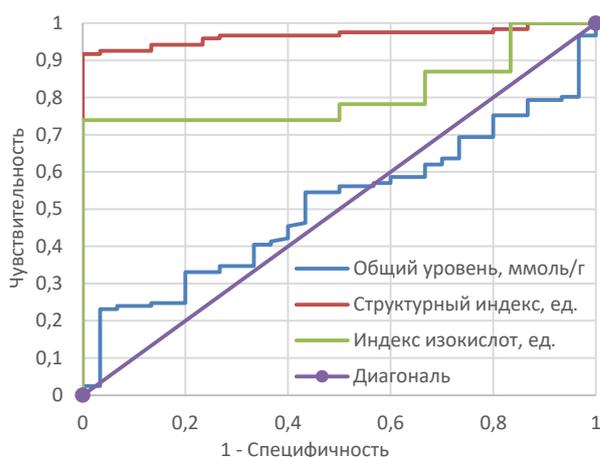
Для определения референсных значений КЖК с помощью ROC-анализа мы использовали относительные значения концентраций КЖК, структурный индекс, индекс изокилот и общий уровень КЖК. Референсные значения вычислялись по значению CutOff, а прогностическая значимость оценивалась по значению площади под кривой AUC. Если значение AUC меньше 0,5, то прогностическая значимость модели отрицательная. Значение AUC равное единице считается идеальным классификатором, для которого характерна 100% специфичность и чувствительность. Результаты ROC-анализа показателей КЖК между основной группой с группой сравнения представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Референсные значения концентраций КЖК в слюне, их расчетные значения и прогностическая значимость между основной группой с группой сравнения

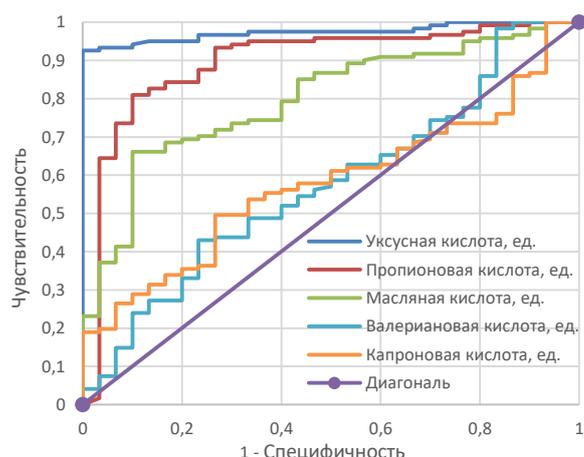
Показатель	Площадь под кривой ROC area (AUC)	Направленность значения	Референсное значение
Общий уровень КЖК, ммоль/г	0,511	не менее	92,46
Структурный индекс, ед.	0,966	не менее	0,389
Индекс изокилот, ед.	0,812	не более	1,311
Относительные концентрации КЖК, ед.			
Уксусная	0,974	не более	0,759
Пропионовая	0,895	не менее	0,239
Изомасляная	0,733	не менее	0,022
Масляная	0,798	не менее	0,028
Изовалериановая	0,782	не менее	0,003
Валериановая	0,576	не менее	0,017
Изокапроновая	0,524	не менее	0,001
Капроновая	0,579	не менее	0,001

Из данных, представленных в таблице 7 видно, что критерии функциональной активности микрофлоры ротоглотки – структурный индекс и индекс изокилот - имеют очень высокие показатели прогностической

значимости, которые составляют 0,966 и 0,812 соответственно (Рисунок 4а, б).



а)



б)

Рисунок 4 – ROC-кривые для интегральных критериев функциональной активности микробиоценоза ротоглотки и концентраций КЖК в слюне

На рисунке 4 показано, что общий уровень КЖК (Рисунок 4а) и относительные концентрации валериановой и капроновой кислот (Рисунок 4б) имеют значения AUC близкие к 0,5, что указывает на их невысокую прогностическую значимость. Классификаторами с наибольшей прогностической значимостью являются структурный индекс и индекс изокислот (AUC=0,966 и 0,812 соответственно) (Рисунок 4а). Также высокие значения AUC установлены для концентрации уксусной и пропионовой кислот (AUC=0,974 и 0,895 соответственно) (Рисунок 4б).

Таким образом, структурный индекс, характеризующий функциональную активность индигенной микрофлоры, и индекс изокислот, характеризующий протеолитическую активность микрофлоры ротоглотки, являются наиболее надежными, приоритетными критериями оценки микробиоценоза ротоглотки.

2.3. Создание математической диагностико-прогностической модели дисбиотических изменений ротоглотки у детей

Из литературных данных известно, что микробиоценоз ротоглотки считается экстракорпоральным органом, для которого свойственна защитная

роль, обеспечивающая его колонизационную резистентность [3, 58]. Угнетение индигенной микрофлоры при увеличении интенсивности бактериальной колонизации ротоглотки нетипичной просветной микрофлорой, приводит к нарушению защитной функции микробиоценоза. Такое состояние биотопа характеризуется как дисбиоз и выражается в увеличении интенсивности бактериальной колонизации условно-патогенной микрофлорой. Дисбиоз ротоглотки классически определяется при помощи бактериологического анализа мазка из ротоглотки. В бактериологическом анализе можно определить не более 1% всех микроорганизмов преимущественно просветной микрофлоры, так как большинство микроорганизмов являются трудно культивируемыми. Интерпретация результатов бактериологического анализа не имеет правил, которые можно трактовать однозначно. Для оценки степени микробиологических нарушений микробиоценоза ротоглотки используется метод экспертной оценки, в котором присутствует субъективное мнение врача-бактериолога.

Слюна связывает собой все биотопы полости рта и является своеобразным буфером, осуществляющим внутреннюю регуляцию.

Для интегральной оценки состояния микробиоценоза ротоглотки актуально использовать концентрации короткоцепочечных жирных кислот. Они включают в себя информацию о функциональной активности микроорганизмов из всех экологических ниш ротоглотки, аэробной и анаэробной части микрофлоры, а применение проекционных методов многомерной статистики позволяет определить прогноз развития заболеваний на ранних стадиях.

Основываясь на вышеизложенных результатах, для выявления специфических соотношений концентраций КЖК в работе использовали их относительные концентрации в слюне (концентрации приведенных к сумме определяемых кислот), чтобы избежать влияния объема слюны на значения определяемых концентраций.

Ранее было установлено, что у пациентов в возрастной группе от 4 месяцев до 14 лет концентрации КЖК в слюне и их расчетные индексы

остаются постоянными. В связи с этим, для расчета математических моделей использовались данные пациентов, ограниченные этим возрастным интервалом.

Для выявления специфических соотношений концентраций метаболитов, характерных для дисбиотических нарушений микробиоценоза при бактериальной, вирусной этиологии, а также у когорты часто болеющих детей, исследовали метаболом микробиоты ротоглотки.

2.3.1. Модель диагностики микробиологических нарушений микробиоценоза ротоглотки у детей

Для определения дисбиоза ротоглотки, связанного с избыточной бактериальной колонизацией, методом линейного дискриминантного анализа провели группировку показателей относительных концентраций КЖК в слюне по результатам бактериологического анализа мазков из ротоглотки. Проведено исследование мазков из ротоглотки бактериологическим методом и образцов слюны методом газо-жидкостной хроматографии у 151 пациента в возрасте от 4 месяцев до 14 лет. Гендерные различия не учитывались.

Используя литературные рекомендации [61], критерием отнесения в основную группу (87 человек) служило присутствие в бактериологическом анализе мазка из ротоглотки условно-патогенной микрофлоры в количестве более $6 \lg$ КОЕ/г. Группа сравнения (64 человека) была сформирована из пациентов, в бактериологическом анализе мазка которых интенсивность обсемененности ротоглотки условно-патогенной микрофлорой не превышала $6 \lg$ КОЕ/г (Таблица 8).

Таблица 8 - 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

Продолжение таблицы 8

Микроорганизмы	Основная группа, частота встречаемости, %; (интенсивность обсемененности, lg КОЕ/г)	Группа сравнения, частота встречаемости, %; (интенсивность обсемененности, lg КОЕ/г)
<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 таблице 8 показано, что в основной группе статистически значимо чаще встречались *Enterobacter spp.* и *Candida spp.* в титре 4 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*, *Staphylococcus hem+*, *Staphylococcus hem+*, *E. coli* и *Acinetobacter spp.* с интенсивностью обсемененности 4-6 lg КОЕ/г, что было задано критериями отбора пациентов.

Результаты статистического исследования параметров функциональной активности микробиоценоза ротоглотки в исследуемых группах представлены в таблице 9. Средние значения показателей в таблице рассчитаны как медианы с указанием интерквартильного разброса в скобках. U-критерий Манна-Уитни использовали для расчета статистически значимых различий [72].

Таблица 9 – Относительные концентрации КЖК в слюне в исследуемых группах

КЖК	Относительные концентрации КЖК		p<0,05
	Основная группа	Группа сравнения	
Уксусная	0,77 (0,73 - 0,81)	0,65 (0,59 - 0,67)	<i>p<0,01</i>
Пропионовая	0,18 (0,14 - 0,22)	0,27 (0,24 - 0,3)	<i>p<0,01</i>
Изомасляная	0,0102 (0,0064 - 0,0177)	0,0236 (0,012 - 0,0286)	<i>p<0,01</i>
Масляная	0,0173 (0,0112 - 0,0256)	0,0316 (0,0237 - 0,043)	<i>p<0,01</i>
Изовалериановая	0,0076 (0,0049 - 0,0124)	0,0149 (0,0094 - 0,0208)	<i>p<0,01</i>
Валериановая	0,0013 (0,0009 - 0,0024)	0,0014 (0,0011 - 0,0023)	0,410442
Изокапроновая	0,0006 (0,0002 - 0,001)	0,0004 (0,0002 - 0,0009)	0,527445
Капроновая	0,0004 (0,0002 - 0,0008)	0,0003 (0,0002 - 0,0007)	0,813813

Примечание: *полужирным курсивом* отмечены значения, указывающие на статистически значимое отличие групп друг от друга, рассчитанно по U-критерию Манна-Уитни, $p<0,05$

В таблице 9 показано, что значения относительных концентраций для уксусной, пропионовой, масляной, изомасляной и изовалериановой кислот в исследуемых группах имеют достоверные отличия ($p<0,05$).

Для расчета прогностической модели наличия микробиологических нарушений микробиоценоза ротоглотки по относительным концентрациям КЖК в слюне с помощью прикладных программ Statistica 8.0 проведен линейный дискриминантный канонический анализ, анализ сопряженности с прямой пошаговой процедурой включения показателей концентраций КЖК в слюне [72] (Таблица 10). На основе включенных компонентов относительных концентраций КЖК в слюне была рассчитана математическая модель с условным названием «Дисбиоз».

Таблица 10 – Характеристика показателей, включенных в модель «Дисбиоз»

Относительные концентрации КЖК	Лямбда Уилкса	Частная лямбда Уилкса	p (<0,05)
Уксусная	0,579306	0,815253	0
Пропионовая	0,533629	0,885035	0,000065
Изомасляная	0,534008	0,884408	0,000062
Масляная	0,540034	0,874539	0,000029
Капроновая	0,519155	0,90971	0,000441

Из таблицы 10 следует, что при проведении линейного дискриминантного анализа были исключены показатели концентраций: изовалерьяновой, валерьяновой и изокапроновой кислот в слюне. О хорошей дискриминации изучаемых признаков свидетельствует значение лямбды Уилкса равное 0,47228 при $p < 0,0001$. Наибольший вклад в дискриминацию исследуемых групп вносит уксусная кислота, так как для нее установлено наименьшее значение частной лямбды Уилкса (0,815253).

Для оценки качества математической модели «Дисбиоз» проанализированы значения правильно классифицированных объектов в группах. Установлено, что 96,48% случаев имеют правильную классификацию. В основной группе 100% объектов классифицированы корректно. В группе сравнения корректность классификации составляет 73,68%.

Также для математической модели «Дисбиоз» были получены высокие прогностические показатели: 95,12% прогностической точности, при 100% специфичности и 95,65% чувствительности.

Наличие нарушения микробиоценоза ротоглотки, характеризующегося высокой бактериальной колонизацией, определяют по линейным классификационным уравнениям, составленным для модели «Дисбиоз».

Значения относительных концентраций соответствующих КЖК слюны пациента подставляются в уравнения, приведенные ниже. Полученные значения функций сравниваются. Функция, значение которой будет максимально, указывает на принадлежность объекта к соответствующей группе.

В соответствии с рассчитанными в программе коэффициентами, составлены классификационные уравнения:

$$F_{OG} = 12210,91 * C_2 + 11890,28 * C_3 + 13156,14 * C_4 + 12226,24 * C_5 + 42514,51 * C_6 - 6025,33$$

$$F_{TC} = 12015,23 * C_2 + 11738,47 * C_3 + 12952,92 * C_4 + 12062,53 * C_5 + 41838,19 * C_6 - 5846,01, \text{ где}$$

F_{OG} – 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;

C_2 – относительная концентрация уксусной кислоты;

C_3 – относительная концентрация пропионовой кислоты;

iC_4 – относительная концентрация изомасляной кислоты;

C_4 – относительная концентрация масляной кислоты;

C_6 – относительная концентрация капроновой кислоты.

В соответствии с задачами исследования, кроме классификации объекта дискриминантный анализ можно применить для оценки степени микробиологических нарушений по глубине изменений соотношений относительных концентраций КЖК слюны.

Дискриминантная функция для исследуемых групп определена уравнением:

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

где D – Дискриминантная функция, определяющая координаты объекта в дискриминантном пространстве;

C_2 – относительная концентрация уксусной кислоты;

C_3 – относительная концентрация пропионовой кислоты;

iC_4 – относительная концентрация изомасляной кислоты;

C_4 – относительная концентрация масляной кислоты;

C_6 – относительная концентрация капроновой кислоты.

Значение дискриминантной функции позволяет определить «координаты» пациента. Соотношение расстояний от «координаты» пациента до центроидов «норма» и «нарушение» позволяет рассчитать коэффициент уникальности – мера глубины изменений функциональной активности микробиоценоза, характерной для дисбиоза ротоглотки.

Значения координат центроидов исследуемых групп в дискриминантном пространстве для модели «Дисбиоз» составляют: для Основной группы – (-0,43384), для Группы сравнения – 2,537968.

По значениям координат центроидов рассчитывали квадрат расстояния Махалобиса исследуемых групп в дискриминантном

пространстве для модели «Дисбиоз» (геометрическое расстояние между точками в n -мерном пространстве) – его значение составляет 8,83. Определяли достоверность различий между группами (p) – его значение составляет $7,34 \cdot 10^{-20}$, что подтверждает статистически значимые различия между группами.

Таким образом, результатом математического моделирования являются классификационные уравнения, которые позволяют определить дисбиоз ротоглотки бактериальной этиологии по значениям концентраций КЖК в слюне. Для этого концентрации КЖК подставляют в уравнение основной группы и уравнение группы сравнения, после чего рассчитывают значения классификационных функций. Если функция основной группы больше функции группы сравнения, то у пациента определяется дисбиоз ротоглотки. Если больше функция группы сравнения, то определяется отсутствие дисбиоза.

Еще одним результатом математического моделирования является дискриминантная функция и координаты центроидов, позволяющие определить коэффициент уникальности для каждого пациента, участвующего в исследовании. Коэффициент уникальности характеризует степень дисбиоза ротоглотки бактериальной этиологии.

2.3.2. Модель диагностики вирусной респираторной инфекции у детей

Из литературы известно, что присутствие респираторного вируса влияет на функциональную активность микробиоценоза ротоглотки, носа и других 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 [155]. Для построения математической модели диагностики респираторной инфекции вирусной этиологии было проведено проспективное исследование образцов слюны и мазков из зева и носа у 47 детей в возрасте от 7 до 14 лет, находящихся на стационарном лечении с диагнозом острый бронхит и острая внебольничная пневмония. В слюне методом газо-жидкостной хроматографии определяли концентрации КЖК.

Мазки из зева и носа использовали для определения ДНК/РНК респираторных вирусов методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Гендерные различия не учитывались.

В мазках из зева и носа определяли ДНК/РНК следующих наиболее часто встречающихся вирусов: *Human metapneumovirus*, *Human rhinovirus*, *Influenza virus A*, *Influenza virus B*, *Epstein-Barr virus*, *Human respiratory syncytial virus*, *Human adenovirus*, *Human parainfluenza virus 1/3, 2/4*, *Human coronavirus*, *Human bocavirus*, *Herpes simplex virus 1/2*, *Cytomegalovirus*. В основную группу были определены пациенты с острым бронхитом и острой внебольничной пневмонией, в мазках у которых были определены ДНК/РНК вышеперечисленных вирусов. Численность группы составила 24 ребенка. В группу сравнения были определены пациенты, в мазках которых ДНК/РНК не определялись (Таблица 11). Численность группы сравнения составила 23 человека.

Результаты статистического исследования параметров функциональной активности микробиоценоза ротоглотки в исследуемых группах представлены в таблице 12.

Таблица 11 - Частота встречаемости вирусов в мазках из носа и зева у детей в основной группе

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

Средние значения показателей в таблице (Таблица 12) рассчитаны как медианы с указанием интерквартильного разброса в скобках. U-критерий Манна-Уитни использовали для расчета статистически значимых различий [72].

Таблица 12 – Относительные концентрации КЖК в слюне в исследуемых группах

КЖК	Относительные концентрации КЖК		p<0,05
	Основная группа	Группа сравнения	
Уксусная	0,83 (0,8 - 0,88)	0,77 (0,7 - 0,78)	0,001
Пропионовая	0,09 (0,08 - 0,11)	0,14 (0,1 - 0,18)	0,03
Изомасляная	0,02 (0,01 - 0,03)	0,03 (0,02 - 0,04)	0,05
Масляная	0,02 (0,02 - 0,02)	0,02 (0,01 - 0,02)	0,75
Изовалериановая	0,01 (0,01 - 0,01)	0,02 (0,01 - 0,02)	0,02
Валериановая	0,01 (0 - 0,01)	0,01 (0,01 - 0,02)	0,25
Изокапроновая	0 (0 - 0,01)	0,01 (0,01 - 0,04)	0,001
Капроновая	0 (0 - 0,01)	0,01 (0 - 0,01)	0,09

Примечание: полужирным курсивом отмечены значения, указывающие на статистически значимое отличие групп друг от друга, рассчитанно по U-критерию Манна-Уитни, p<0,05

В таблице 12 показано, что значения относительных концентраций для уксусной, пропионовой, изовалериановой и изокапроновой кислот в исследуемых группах имеют статистически значимые отличия (p<0,05).

Для расчета прогностической модели присутствия вируса в микробиоценозе ротоглотки по относительным концентрациям КЖК в слюне с помощью прикладных программ Statistica 8.0 проведен линейный дискриминантный канонический анализ, анализ сопряженности с прямой пошаговой процедурой включения показателей концентраций КЖК в слюне (Таблица 13). На основе включенных компонентов относительных концентраций КЖК в слюне была рассчитана математическая модель с условным названием «Вирус».

Таблица 13 – Характеристика показателей, включенных в модель «Вирус»

Относительные концентрации КЖК	Лямбда Уилкса	Частная лямбда Уилкса	p (<0,05)
Изокапроновая	0,896469	0,728786	0,000407
Капроновая	0,752521	0,868193	0,018123

Из таблицы 13 следует, что при проведении линейного дискриминантного анализа были исключены показатели концентраций: уксусной, пропионовой, изомасляной масляной, изовалерьяновой, и валерьяновой кислот в слюне. О хорошей дискриминации изучаемых признаков свидетельствует значение лямбды Уилкса равное 0,6533 при $p < 0,0002$. Наибольший вклад в дискриминацию исследуемых групп вносит изокапроновая кислота, так как для нее установлено наименьшее значение частной лямбды Уилкса (0,728786).

Для оценки качества математической модели «Вирус» проанализированы значения правильно классифицированных объектов в группах. Установлено, что 81,4% случаев имеют правильную классификацию. В основной группе 90% объектов классифицированы корректно. В группе сравнения корректность классификации составляет 73,91%.

Также для математической модели «Вирус» были получены прогностические показатели: 81,40% прогностической точности, при 89,47% специфичности и 75,00% чувствительности.

Наличие нарушения микробиоценоза ротоглотки, характеризующегося присутствием респираторных вирусов, определяют по линейным классификационным уравнениям, составленным для модели «Вирус».

Значения относительных концентраций соответствующих КЖК слюны пациента подставляются в уравнения, приведенные ниже. Полученные значения функций сравниваются. Функция, значение которой будет максимально, указывает на принадлежность объекта к соответствующей группе.

В соответствии с рассчитанными в программе коэффициентами, составлены классификационные уравнения:

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

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

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;

iC_6 – относительная концентрация изокапроновой кислоты;

C_6 – относительная концентрация капроновой кислоты.

Дискриминантная функция для исследуемых групп представлена уравнением:

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

где D – дискриминантная функция, определяющая координаты объекта в дискриминантном пространстве;

iC_6 – относительная концентрация изокапроновой кислоты;

C_6 – относительная концентрация капроновой кислоты.

Значения координат центроидов исследуемых групп в дискриминантном пространстве для модели «Вирус» составляют: для Основной группы – 0,762772, для Группы сравнения – (-0,66328).

По значениям координат центроидов рассчитывали квадрат расстояния Махалонобиса исследуемых групп в дискриминантном пространстве для модели «Вирус» – его значение составляет 2,033623. Определяли достоверность различий между группами (p) – его значение составляет 0,000201, что подтверждает статистически значимые различия между группами.

Для расчета степени влияния респираторного вируса на функциональное состояние микробиоценоза ротоглотки можно рассчитать и использовать значения коэффициента уникальности.

2.3.3. Модель выявления часто болеющих детей в острый период заболевания

По литературным данным около 80% всей заболеваемости дыхательных путей приходится на часто болеющих детей [128, 133, 154, 162]. По данным ВОЗ в первые 3 года жизни дети переносят в среднем по 6 – 8 ОРЗ за год [154, 177]. Для детей, заболеваемость которых выше этих показателей, используют термин повторные респираторные инфекции [18, 97, 102, 106, 119, 128]. В России доля повторных респираторных инфекций составляет 15-75% от всех ОРЗ, в Европе — 15-25% [18, 97, 102, 106, 162, 171]. Группа повторных респираторных инфекций не однородна и включает в себя 5 подгрупп: дети с наличием аллергической патологии; неврологической патологией; дети с вегето-сосудистой дистонией; дети с поражением лимфатической системы; дети с обменно-конституционными нарушениями. Морфофункциональные дефекты различных органов у детей с повторными респираторными инфекциями способствует формированию хронических очагов. Такие очаги хронических инфекций могут привести в дальнейшем к аутоиммунным и аллергическим заболеваниям [18, 28, 51, 68, 74, 76, 92]. Основанием для включения ребенка в группу часто болеющих детей является подход, разработанный В.Ю. Альбицким и А.А.Барановым. В основу данного подхода легла частота респираторных заболеваний в течение года у детей с поправкой на возраст [4]. Для изучения особенностей метаболического профиля микробиоценоза ротоглотки у часто болеющих детей использовали метод микробиом-ассоциированной метаболомики.

Математическая модель, позволяющая определить принадлежность ребенка, находящегося в остром периоде заболевания, к группе часто болеющих, создана, учитывая особенности функционального состояния микробиоценоза ротоглотки у таких детей. Модель была разработана на основе результатов биохимических анализов слюны (методом газо-жидкостной хроматографии определяли концентрации КЖК) 47 пациентов в возрасте от 7 до 14 лет, находящихся в инфекционном отделении ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт

им. М.Ф. Владимирского» с диагнозами острый бронхит и острая внебольничная пневмония. В основную группу были определены часто болеющие дети. Отбор в основную группу проводил врач педиатр по анамнестическим данным, в соответствии с критериями В.Ю. Альбицкого и А.А. Баранова. Численность основной группы составила 13 человек. Группа сравнения состояла из пациентов того же отделения, которые не относились к часто болеющим детям. Численность группы сравнения 34 пациента. Гендерные различия не учитывались.

В исследуемых группах пациентов проанализированы результаты бактериологического анализа мазков из ротоглотки. Результаты представлены в таблице 14.

Таблица 14 - 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), $p < 0,05$

В таблице 14 показано, что в основной группе статистически значимо 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 [48, 55].

Результаты статистического исследования параметров функциональной активности микробиоценоза ротоглотки в исследуемых группах представлены в таблице 15. Средние значения показателей в таблице рассчитаны как медианы с указанием интерквартильного разброса в скобках. U-критерий Манна-Уитни использовали для расчета статистически значимых различий [72].

Таблица 15 – Относительные концентрации КЖК в слюне в исследуемых группах

КЖК	Относительные концентрации КЖК		p<0,05
	Основная группа	Группа сравнения	
Уксусная	0,82 (0,77 - 0,87)	0,77 (0,72 - 0,84)	0,25
Пропионовая	0,1 (0,09 - 0,14)	0,1 (0,08 - 0,18)	0,72
Изомасляная	0,02 (0,01 - 0,04)	0,02 (0,02 - 0,03)	0,7
Масляная	0,02 (0,01 - 0,02)	0,02 (0,01 - 0,02)	0,28
Изовалериановая	0,01 (0,01 - 0,01)	0,01 (0,01 - 0,02)	0,17
Валериановая	0,01 (0 - 0,01)	0,01 (0,01 - 0,02)	0,06
Изокапроновая	0,01 (0 - 0,02)	0,01 (0 - 0,01)	0,92
Капроновая	0,01 (0 - 0,01)	0 (0 - 0,01)	0,64

Примечание: полужирным курсивом отмечены значения, указывающие на статистически значимое отличие групп друг от друга, рассчитанно по U-критерию Манна-Уитни, p<0,05

В таблице 15 показано, что все значения концентраций исследуемых КЖК для исследуемых групп не имеют статистически значимых отличий.

Для расчета прогностической модели принадлежности ребенка, находящегося в остром периоде заболевания, к группе часто болеющих по относительным концентрациям КЖК в слюне с помощью прикладных программ Statistica 8.0 проведен линейный дискриминантный канонический анализ, анализ сопряженности с прямой пошаговой процедурой включения показателей концентраций КЖК в слюне (Таблица 16). На основе

включенных компонентов относительных концентраций КЖК в слюне была рассчитана математическая модель с условным названием «ЧБД» (часто болеющие дети в острый период заболевания).

Таблица 16 – Характеристика показателей, включенных в модель «ЧБД»

Относительные концентрации КЖК	Лямбда Уилкса	Частная лямбда Уилкса	p (<0,05)
Уксусная	0,876861	0,847763	0,012812
Пропионовая	0,895527	0,830093	0,008219
Изовалериановая	0,935365	0,794739	0,003328
Валериановая	0,903989	0,822323	0,006751

Из таблицы 16 следует, что при проведении линейного дискриминантного анализа были исключены показатели относительных концентраций: изомасляной, масляной, изокапроновой, и капроновой кислот в слюне. Значение лямбда Уилкса составило 0,74337, $p < 0,021$, что свидетельствует о возможности дискриминации изучаемых признаков. Показано, что наименьшее значение частной лямбды Уилкса отмечается для изовалериановой кислоты, что указывает на наибольший вклад этого показателя в дискриминацию групп. Далее дискриминацию групп определяют по убывающей - валериановая, пропионовая и уксусная кислоты. Присутствие уксусной кислоты указывает на вовлеченность в дискриминацию аэробных микроорганизмов и продуцентов пропионовой кислоты, которая обладает бактерицидным эффектом. Отсутствие изокилот, за исключением изовалериановой, указывает на вовлеченность в дискриминацию групп сахаролитической, просветной микрофлоры.

Для оценки качества математической модели «ЧБД» проанализированы значения правильно классифицированных объектов в группах. Установлено, что 83,72% случаев имеют правильную классификацию. В основной группе 57,14% объектов классифицированы корректно. В группе сравнения корректность классификации составляет 96,55%.

Также для математической модели «ЧБД» были получены прогностические показатели: 83,72% прогностической точности, при 82,35% специфичности и 88,89% чувствительности.

Принадлежность ребенка, находящегося в остром периоде заболевания, к когорте часто болеющих детей, определяют по линейным классификационным уравнениям, составленным для модели «ЧБД».

Значения относительных концентраций соответствующих КЖК слюны пациента подставляются в уравнения, приведенные ниже. Полученные значения функций сравниваются. Функция, значение которой будет максимально, указывает на принадлежность объекта к соответствующей группе.

В соответствии с рассчитанными в программе коэффициентами, составлены классификационные уравнения:

$$F_{ог} = 1368,494 * C_2 + 1538,684 * C_3 + 7103,235 * iC_5 + 2165,619 * C_5 - 683,304$$

$$F_{гс} = 1403,533 * C_2 + 1583,797 * C_3 + 7338,304 * iC_5 + 2241,567 * C_5 - 719,622$$

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;

C_2 – относительная концентрация уксусной кислоты;

C_3 – относительная концентрация пропионовой кислоты;

iC_5 – относительная концентрация изовалериановой кислоты;

C_5 – относительная концентрация валериановой кислоты.

Дискриминантная функция для исследуемых групп представлена уравнением:

$$D = 28,618 * C_2 + 36,8458 * C_3 + 191,9914 * iC_5 + 562,0307 * C_5 - 30,4709,$$

где D – дискриминантная функция, определяющая координаты объекта в дискриминантном пространстве;

C_2 – относительная концентрация уксусной кислоты;

C_3 – относительная концентрация пропионовой кислоты;

iC5 – относительная концентрация изовалериановой кислоты;

C5 – относительная концентрация валериановой кислоты.

Значения координат центроидов исследуемых групп в дискриминантном пространстве для модели «ЧБД» составляют: для Основной группы – (-0,82574), для Группы сравнения – 0,398633.

По значениям координат центроидов рассчитывали квадрат расстояния Махаланобиса исследуемых групп в дискриминантном пространстве для модели «ЧБД» – его значение составляет 1,499. Определяли достоверность различий между группами (p) – его значение составляет 0,020988, что подтверждает статистически значимые различия между группами.

Для расчета степени соответствия микробиоценоза ротоглотки пациента в остром периоде заболевания микробиоценозу ротоглотки часто болеющего ребенка, можно рассчитать и использовать значения коэффициента уникальности.

2.3.4. Модель выявления часто болеющих детей, находящихся в состоянии клинической ремиссии

Для изучения особенностей метаболического профиля микробиоценоза ротоглотки у часто болеющих детей, находящихся в состоянии клинической ремиссии, использовали результаты анализов слюны (методом газожидкостной хроматографии определяли концентрации КЖК) 193 пациентов в возрасте от 7 до 14 лет, находящихся в санатории. В основную группу были определены клинически здоровые дети, но по анамнестическим данным, в соответствии с критериями В.Ю. Альбицкого и А.А. Баранова, относящиеся к часто болеющим. Отбор в основную группу проводил врач педиатр. Численность основной группы составила 53 человека, остальные дети (140 человек) вошли в группу сравнения, состоящую из детей не соответствующих критериям В.Ю. Альбицкого и А.А. Баранова [4]. Гендерные различия не учитывались.

В исследуемых группах пациентов проанализированы результаты бактериологического анализа мазков из ротоглотки. Результаты представлены в таблице 17.

Таблица 17 - 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 таблице 17 показано, что в основной группе статистически значимо чаще встречались *Staphylococcus spp.*, *Candida spp.* в титрах 4-4,5 lg КОЕ/г. Также в основной группе высеивались 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 [55].

Результаты статистического исследования параметров функциональной активности микробиоценоза ротоглотки в исследуемых группах представлены в таблице 18. Средние значения показателей в таблице рассчитаны как медианы с указанием интерквартильного разброса в скобках. U-критерий

Манна-Уитни использовали для расчета статистически значимых различий [72].

Таблица 18 – Относительные концентрации КЖК в слюне в исследуемых группах

КЖК	Относительные концентрации КЖК		p<0,05
	Основная группа	Группа сравнения	
Уксусная	0,83 (0,74 - 0,88)	0,75 (0,67 - 0,81)	0,000011
Пропионовая	0,11 (0,08 - 0,18)	0,19 (0,15 - 0,24)	0,000009
Изомасляная	0,015 (0,008 - 0,024)	0,02 (0,02 - 0,03)	0,000157
Масляная	0,014 (0,009 - 0,023)	0,022 (0,013 - 0,033)	0,000827
Изовалериановая	0,008 (0,005 - 0,013)	0,011 (0,007 - 0,018)	0,009206
Валериановая	0,003 (0,001 - 0,01)	0,001 (0,001 - 0,003)	0,000135
Изокапроновая	0,002 (0,001 - 0,003)	0,001 (0,001 - 0,003)	0,27765
Капроновая	0,001 (0,001 - 0,003)	0,001 (0 - 0,002)	0,002409

Примечание: полужирным курсивом отмечены значения, указывающие на статистически значимое отличие групп друг от друга, рассчитанно по U-критерию Манна-Уитни, p<0,05

В таблице 18 показано, что значения всех концентраций исследуемых КЖК, кроме изокапроновой кислоты, для исследуемых групп имеют статистически значимые отличия.

Для расчета прогностической модели принадлежности ребенка, находящегося в состоянии клинической ремиссии, к группе часто болеющих по относительным концентрациям КЖК в слюне с помощью прикладных программ Statistica 8.0 проведен линейный дискриминантный канонический анализ, анализ сопряженности с прямой пошаговой процедурой включения показателей концентраций КЖК в слюне (Таблица 19). На основе включенных компонентов относительных концентраций КЖК в слюне была рассчитана математическая модель с условным названием «ЧБД+» (часто болеющие дети в состоянии клинической ремиссии).

Таблица 19 – Характеристика показателей, включенных в модель «ЧБД+»

Относительные концентрации КЖК	Лямбда Уилкса	Частная лямбда Уилкса	p (<0,05)
Изомасляная	0,894418	0,953905	0,002933

Продолжение таблицы 19

Относительные концентрации КЖК	Лямбда Уилкса	Частная лямбда Уилкса	p (<0,05)
Масляная	0,870997	0,979555	0,049062
Изовалериановая	0,878932	0,970711	0,018232
Капроновая	0,926164	0,921208	0,000088

Из таблицы 19 следует, что при проведении линейного дискриминантного анализа были исключены относительные концентрации: уксусной, пропионовой, валериановой и изокапроновой кислот в слюне. О хорошей дискриминации изучаемых признаков свидетельствует значение лямбды Уилкса равное 0,85319 при $p < 0,00001$. Наибольший вклад в дискриминацию исследуемых групп вносит капроновая кислота, так как для нее установлено наименьшее значение частной лямбды Уилкса (0,921208).

При сравнении компонентов КЖК, участвующих в дискриминации, можно отметить, что в модели «ЧБД» для острого периода и в модели «ЧБД+» для состояния клинической ремиссии в уравнении участвует изовалериановая кислота. В острый период изовалериановая кислота вносит наибольший вклад в дискриминацию групп, в то время как в состоянии ремиссии наибольшую дискриминацию вносит капроновая кислота. Отсутствие уксусной кислоты указывает на определяющую роль анаэробных микроорганизмов в функциональной активности микробиоценоза ротоглотки, а присутствие масляной кислоты указывает на вовлеченность в дискриминацию групп индигенной микрофлоры, продуцентов масляной кислоты, обеспечивающих колонизационную резистентность нормальной микрофлоры.

Для оценки качества математической модели «ЧБД+» проанализировали значения правильно классифицированных объектов в группах. Установлено, что 76,68% случаев имеют правильную классификацию. В основной группе 24,53% объектов классифицированы корректно. В группе сравнения корректность классификации составляет 96,43%.

Также для математической модели «ЧБД+» были получены прогностические показатели: 76,68% прогностической точности, при 77,14% специфичности и 72,22% чувствительности.

Принадлежность ребенка, находящегося в состоянии клинической ремиссии, к когорте часто болеющих детей, определяют по линейным классификационным уравнениям, составленным для модели «ЧБД+».

Значения относительных концентраций соответствующих КЖК слюны пациента подставляются в уравнения, приведенные ниже. Полученные значения функций сравниваются. Функция, значение которой будет максимально, указывает на принадлежность объекта к соответствующей группе.

В соответствии с рассчитанными в программе коэффициентами составлены классификационные уравнения:

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

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

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;

$iC4$ – относительная концентрация изомасляной кислоты;

$C4$ – относительная концентрация масляная кислоты;

$iC5$ – относительная концентрация изовалериановой кислоты;

$C6$ – относительная концентрация капроновая кислоты.

Дискриминантная функция для исследуемых групп определена уравнением:

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

где D – дискриминантная функция, определяющая координаты объекта в дискриминантном пространстве;

$iC4$ – относительная концентрация изомасляной кислоты;

$C4$ – относительная концентрация масляная кислоты;

iC5 – относительная концентрация изовалериановой кислоты;

C6 – относительная концентрация капроновой кислоты.

Значения координат центроидов исследуемых групп в дискриминантном пространстве для модели «ЧБД+» составляют: для Основной группы – (-0,67069), для Группы сравнения – 0,253903.

По значениям координат центроидов рассчитывали квадрат расстояния Махалобиса исследуемых групп в дискриминантном пространстве для модели «ЧБД+» – его значение составляет 0,854866. Определяли достоверность различий между группами (p) – его значение составляет 0,000005, что подтверждает статистически значимые различия между группами.

Для расчета степени соответствия микробиоценоза ротоглотки пациента в состоянии клинической ремиссии микробиоценозу ротоглотки часто болеющего ребенка, можно рассчитать и использовать значения коэффициента уникальности.

Заключение по главе

Классификационные уравнения линейного дискриминантного анализа относительных концентраций короткоцепочечных жирных кислот в слюне позволяют прогнозировать дисбиотические нарушения ротоглотки, присутствие респираторного вируса и очага хронической инфекции (часто болеющие дети) по специфическому соотношению концентраций КЖК в слюне. Статистическая значимость квадратов расстояний Махалобиса между центроидами основной группы и группы сравнения подтверждает состоятельность моделей. Прогностическая точность и чувствительность моделей снижается в ряду: «Дисбиоз» (95% и 96% соответственно) - «ЧБД» (84% и 89%) - «Вирус» (81% и 75%) - «ЧБД+» (77% и 72%), а специфичность в ряду: «Дисбиоз» (100%) - «Вирус» (89%) - «ЧБД» (82%) - «ЧБД+» (77%). Высокая специфичность и чувствительность модели «Дисбиоз» связана с большим объемом проанализированных результатов анализов (151 пациент). Модели «Вирус» и «ЧБД» построены на результатах анализов пациентов,

находящихся в остром периоде инфекционного процесса. Модель «ЧБД+» построена на результатах анализов здоровых детей. Таким образом, можно отметить, что при остром инфекционном процессе функциональная активность микробиоценоза ротоглотки имеет более высокую прогностическую точность, чем у здоровых пациентов.

ГЛАВА 3. Оценка особенностей микробиоценозов ротоглотки у детей, выявленных методом математического моделирования

Среди различных методов оценки состояния микробиоценоза ротоглотки, особое место занимают современные методы предиктивной диагностики [30]. В настоящей работе использовали метод микробиом-ассоциированной метаболомики. МАМ позволяет определить и дифференцировать изменения микробиоценоза ротоглотки, связанные с избыточной бактериальной колонизацией, наличием респираторного вируса и принадлежностью к группе часто болеющих детей по специфическому соотношению концентраций метаболитов микроорганизмов. В исследование включено 47 детей от 7 до 14 лет с диагнозами острый бронхит и острая внебольничная пневмония, находившихся в инфекционном отделении больницы. Критериями сравнения основной группы и группы сравнения являются частоты встречаемости дисбиоза, респираторного вируса в микробиоценозе ротоглотки или принадлежность к группе часто болеющих, определяемые по диагностическим коэффициентам линейного дискриминантного анализа концентраций КЖК в слюне. Другой критерий сравнения - коэффициент уникальности, который указывает на степень соответствия специфического соотношения концентраций КЖК в слюне, полученных в моделях «Дисбиоз», «Вирус», «ЧБД» и «ЧБД+».

На 1 этапе в исследуемой выборке согласно диагнозу, поставленному лечащим врачом на основании клинико-anamnestических данных и данных лабораторно-физикального обследования, были выделены группы больных «Острый бронхит» и «Острая пневмония». Численность группы больных «Острый бронхит» составила 23 человека, а «Острая пневмония» — 24 человека. Гендерные различия не учитывались.

На 2 этапе в этой же исследуемой выборке согласно анамнестическим данным, по критериям, В.Ю. Альбицкого и А.А. Баранова [4] врачом педиатром были определены группы «ЧБД» - часто болеющие дети и «ЭБД» - эпизодически болеющие. Численность группы «ЧБД» составила 9 человек, а численность группы «ЭБД» — 34 человека. Гендерные различия не

учитывались.

Состояние микробиоценоза ротоглотки в группах «Острый бронхит» - «Острая пневмония» и «ЧБД» - «ЭБД» оценивали:

- по концентрациям КЖК в слюне, определяемым методом ГЖХ;
- по интенсивности бактериальной колонизации и частоте встречаемости изолированных штаммов микроорганизмов, выявляемых культуральным методом посева на питательные среды с дальнейшей идентификацией по биохимическим и морфологическим признакам;
- с помощью ПЦР-диагностики возбудителей респираторных заболеваний, определяемых в мазках из зева и носа.

Для анализа функционального состояния микробиоценоза ротоглотки применяли методы микробиом-ассоциированной метаболомики – созданные и описанные ранее математические модели «Дисбиоз», «Вирус», «ЧБД» и «ЧБД+».

Влияние вида респираторного вируса на функциональное состояние микробиоценоза ротоглотки определяли сравнением средних значений коэффициентов уникальности моделей «Дисбиоз» и «Вирус».

3.1. Характеристика функционального состояния микробиоценоза ротоглотки при остром бронхите и острой внебольничной пневмонии у детей (по математическим моделям)

Для оценки статистической значимости различий функционального состояния микробиоценоза ротоглотки между группами «Острый бронхит» и «Острая пневмония» сравнивали средние величины значений концентраций КЖК в слюне по U-критерию Манна-Уитни. Для оценки направленности изменений функционального состояния микробиоценоза ротоглотки определяли количество значений в выборке, которые укладываются в рамки референсных значений, полученных в главе 2.2. Статистическую значимость отличий в группах определяли в соответствии с критерием Хи-квадрат. Параметры функциональной активности микробиоценоза ротоглотки для исследуемых групп представлены в таблице 20.

Таблица 20 – Функциональная активность микробиоценоза ротоглотки у детей в группах «Острый бронхит» и «Острая пневмония»

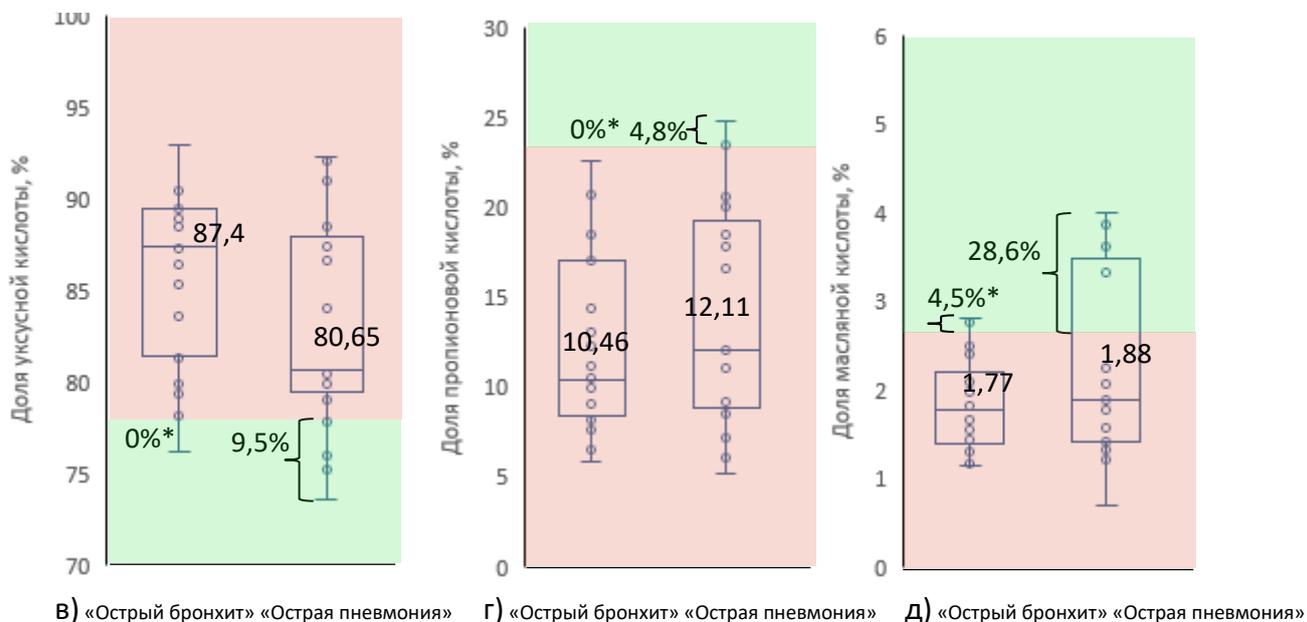
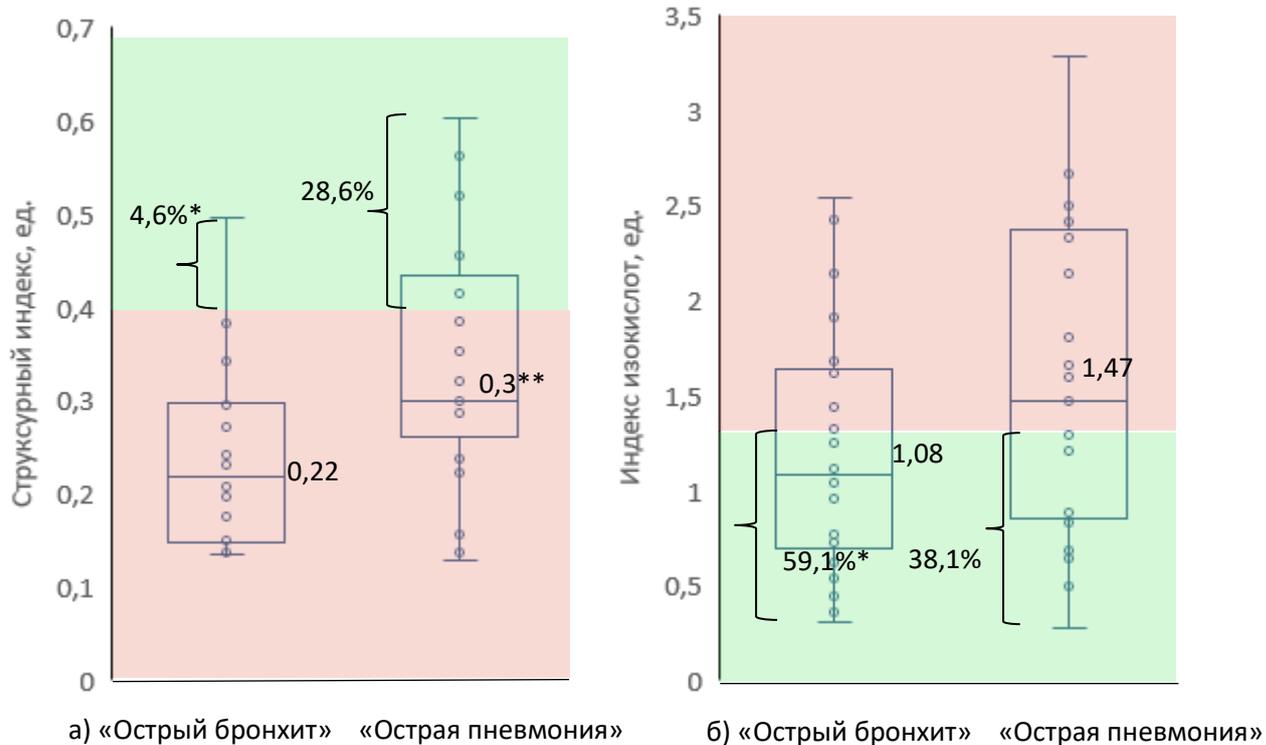
Показатели	Группа «Острый бронхит»	Группа «Острая пневмония»	Статистическая значимость $p < 0,05$
Концентрации КЖК в слюне средние (медианные значения с интерквартильным разбросом)			
Структурный индекс, ед	0,22 (0,16 - 0,29)	0,3 (0,29 - 0,41)	0,0081
Индекс изокислот, ед.	1,08 (0,73 - 1,58)	1,47 (0,88 - 2,32)	0,1143
Доля уксусной кислоты, %	87,4 (82,01 - 89,37)	80,65 (79,9 - 87,46)	0,1449
Доля пропионовой кислоты, %	10,46 (8,64 - 16,35)	12,11 (9,17 - 18,45)	0,2535
Доля масляной кислоты, %	1,77 (1,44 - 2,13)	1,88 (1,41 - 3,33)	0,3434

Примечание: полужирным курсивом отмечены значения, указывающие на статистически значимое отличие групп друг от друга, рассчитанно по U-критерию Манна-Уитни, $p < 0,05$

Из представленных данных (Таблица 20) следует, что у пациентов при остром бронхите среднее значение структурного индекса статистически значимо ниже, чем у пациентов при острой пневмонии (0,22 - при остром бронхите и 0,3 – при острой пневмонии).

Концентрации КЖК в слюне, критерии функциональной активности микробиоценоза ротоглотки в исследуемых группах и их частоты встречаемости, находящиеся в рамках референсных значений, представлены на рисунке 5 (а, б, в, г, д).

Полученные данные (Рисунок 5а) свидетельствуют, что среднее значение структурного индекса в группе детей «Острая пневмония» статистически значимо выше, чем в группе детей «Острый бронхит». Значения структурного индекса в группе «Острая пневмония» смещены в сторону нормальных значений. В группе «Острая пневмония» количество детей, для которых значение структурного индекса находится в рамках референсных значений, больше, чем в группе детей «Острый бронхит» (28,6% и 4,6% соответственно).



■ - показатели в рамках референсных значений ■ - показатели вне референсных значений

Рисунок 5 - Концентрации КЖК в слюне, критерии функциональной активности микробиоценоза ротоглотки у детей в группах «Острый бронхит» и «Острая пневмония», частоты их встречаемости, находящиеся в рамках референсных значений

Примечание: * - отмечено статистически значимое отличие частот встречаемости значений, находящихся в рамках референсных, между группами, рассчитанно по критерию согласия Пирсона (Chi-квадрат), $p < 0,05$; ** - отмечена разница между средними значениями, указывающими на статистически значимое отличие групп друг от друга, рассчитанно по U-критерию Манна-Уитни, $p < 0,05$

Структурный индекс является интегральной характеристикой функциональной активности индигенной, анаэробной микрофлоры. Снижение структурного индекса указывает на подавление функциональной активности индигенной микрофлоры ротоглотки. В группе детей «Острый бронхит» статистически значимо снижена функциональная активность индигенной микрофлоры ротоглотки по сравнению с группой детей «Острая пневмония».

При оценке протеолитической активности микрофлоры ротоглотки статистически значимой разницы между средними значениями индекса изокислот в исследуемых группах не установлено (Рисунок 5б). При этом в группе «Острый бронхит» количество детей, у которых значение индекса изокислот находится в рамках референсных значений, больше, чем в группе «Острая пневмония» (59,1% и 38,1% соответственно). Таким образом, при острой пневмонии преобладает анаэробная микрофлора с повышенной протеолитической активностью.

Анализ структуры метаболической активности показывает, что в исследуемых группах между средними значениями концентраций уксусной, пропионовой и масляной кислот статистически значимая разница не наблюдается. При рассмотрении частот встречаемости исследуемых кислот в рамках референсных значений установлено, что в группе детей «Острый бронхит» доля уксусной кислоты (Рисунок 5в) увеличена у 100% пациентов, а доля масляной кислоты в рамках референсных значений (Рисунок 5д) определена только у 4,5% пациентов. В группе детей «Острая пневмония» статистически значимо выше количество пациентов с нормальными значениями пропионовой кислоты (4,8% детей) (Рисунок 5г), при этом только у 9,5% детей доля уксусной кислоты и у 28,6% детей доля масляной кислоты находятся в норме. Масляная кислота является энергосубстратом для эпителиоцитов. Дефицит масляной кислоты приводит к нарушению проницаемости эпителия и снижению колонизационной резистентности микробиоценоза. Снижение концентрации масляной кислоты может быть причиной подавления функциональной активности индигенной микрофлоры

и снижения колонизационной резистентности в большей степени у пациентов при остром бронхите, по сравнению пациентами с острой внебольничной пневмонией.

Результаты бактериологического исследования мазков из ротоглотки представлены в таблице 21. Сравнение показателей в группах проводили по критерию Хи-квадрат частот встречаемости изолированных штаммов микроорганизмов. Также в таблице 21 указана средняя (медианная) интенсивность бактериальной колонизации.

Таблица 21 – Бактериологическое исследование мазков из ротоглотки у детей в группах «Острый бронхит» и «Острая пневмония»

Микроорганизмы	Группа «Острый бронхит», частота встречаемости, %; (интенсивность обсемененности, lg КОЕ/г)	Группа «Острая пневмония» частота встречаемости, %; (интенсивность обсемененности, lg КОЕ/г)
<i>Streptococcus α-hem</i> ⁺	100 (7)	100 (6,5)
<i>Staphylococcus aureus</i>	17 (4,5) *	8 (4)
<i>Neisseria spp.</i>	91 (6)	92 (7)
<i>Klebsiella spp.</i>	9 (4,5)	8 (5)
<i>Pseudomonas spp.</i>	—	8 (3,5) *
<i>Enterobacter spp.</i>	—	8 (4) *
<i>Candida spp.</i>	39 (4) *	21 (4)

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

Полученные данные показали, что микрофлора ротоглотки у большинства детей из групп «Острый бронхит» и «Острая пневмония» представлена микроорганизмами, типичными для данного биотопа (*Streptococcus spp. α-hem*⁺, *Neisseria spp.*) с интенсивностью бактериальной колонизации равной 6-7 lg КОЕ/г (Таблица 21). Условно-патогенные микроорганизмы, такие как *S.aureus*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, высеваются в титре 4-5 lg КОЕ/г.

Статистически значимое увеличение частот встречаемости микроорганизмов у пациентов в группе «Острый бронхит» отмечаются для

S.aureus (17% для группы «Острый бронхит» и 8% – «Острая пневмония») и *Candida spp.* (39% для группы «Острый бронхит» и 21% – «Острая пневмония»). В группе «Острая пневмония» выявляются штаммы *Enterobacter spp.* и *Pseudomonas spp.* у 8% пациентов. Эти микроорганизмы не встречаются в микробиоценозе ротоглотки у детей в группе «Острый бронхит».

Таким образом, по результатам микробиологического исследования интенсивности бактериальной колонизации ротоглотки отмечается снижение биоразнообразия микробиоценоза у пациентов в группе «Острый бронхит» с увеличением частот встречаемости штаммов *Candida spp.* и *S.aureus* в мазке. В группе пациентов «Острая пневмония» в мазках из ротоглотки обнаруживаются штаммы *Enterobacter spp.*, *Pseudomonas spp.* в титре 3 – 4,5 lg КОЕ/г, которые не являются типичной микрофлорой ротоглотки.

Методом молекулярно-генетического исследования мазков из зева и носа у пациентов определяли присутствие фрагментов ДНК/РНК респираторных вирусов. Частота встречаемости штаммов в мазках пациентов в группах «Острый бронхит» и «Острая пневмония» представлена в таблице 22.

Таблица 22 – Частота встречаемости респираторных вирусов в мазках из носа и зева у детей в группах «Острый бронхит» и «Острая пневмония»

Штаммы респираторных вирусов	Частота встречаемости, %	
	Группа «Острый бронхит»	Группа «Острая пневмония»
<i>H.rhinovirus</i>	22 *	8
<i>H.metapneumovirus</i>	17 *	4
<i>Epstein-Barr virus</i>	9 *	0
<i>H.parainfluenza virus 1/3, 2/4</i>	4 *	0
<i>H.respiratory syncytial virus</i>	4	13 *
<i>Influenza virus B</i>	4 *	0
<i>H.adenovirus</i>	0	8 *
<i>Influenza virus A</i>	4	4

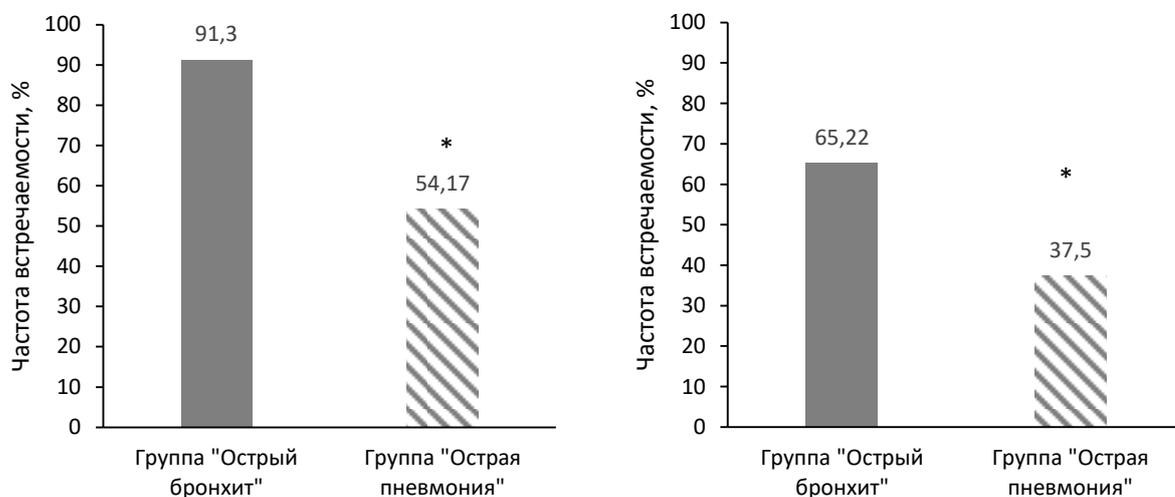
Примечание: * - отмечено статистически значимое отличие между группами, рассчитанно по критерию согласия Пирсона (Chi-квадрат), $p < 0,05$

В таблице 22 показано, что частота встречаемости 5 респираторных вирусов *H.metapneumovirus*, *H.rhinovirus*, *I.virus B*, *Epstein-Barr virus*, *H.parainfluenza virus 1/3*, *2/4* статистически значимо выше у пациентов в группе «Острый бронхит», чем в группе «Острая пневмония». В группе пациентов «Острая пневмония» обнаруживается *H.adenovirus*, который не встречается в группе пациентов «Острый бронхит». Наибольшее значение частоты встречаемости в группе пациентов «Острый бронхит» имеет *H.rhinovirus*. Этот вирус обнаруживается у 22% детей данной группы. Вторым по частоте встречаемости выявляется *H.metapneumovirus* (в 17% случаев). Наибольшее значение частоты встречаемости в группе пациентов «Острая пневмония» имеет *H.respiratory syncytial virus* – у 13% пациентов.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что острый бронхит и острую внебольничную пневмонию вызывают различные виды наиболее активных респираторных вирусов: в группе детей «Острый бронхит» это - *H.rhinovirus*, а в группе детей «Острая пневмония» — *H.respiratory syncytial virus*. Суммарная частота встречаемости респираторных вирусов в микробиоценозе ротоглотки больше в группе пациентов «Острый бронхит», что может быть связано с тропностью этих вирусов к бронхам [77].

Для интегральной оценки предиктивным анализом концентраций КЖК в слюне дисбиотических нарушений микробиоценоза ротоглотки, связанных с высокой бактериальной колонизацией и/или присутствием респираторного вируса сравнивали частоты встречаемости дисбиозов и присутствия респираторных вирусов у детей в группах «Острый бронхит» и «Острая пневмония». Результаты сравнения представлены на рисунке 6. Частота встречаемости микробиоценозов со специфическим соотношением метаболитов, которое характерно для дисбиотических состояний, в группах детей «Острый бронхит» и «Острая пневмония», представлена на рисунке ба (модель «Дисбиоз»). Частота встречаемости микробиоценозов со специфическим соотношением метаболитов, которое характерно для присутствия в микробиоценозе респираторного вируса, в группах детей

«Острый бронхит» и «Острая пневмония», представлены на рисунке 6б (модель «Вирус»).



а) модель «Дисбиоз»

б) модель «Вирус»

Рисунок 6 – Частоты встречаемости дисбиозов бактериальной и вирусной этиологии, рассчитанных по классификационным уравнениям моделей «Дисбиоз» и «Вирус» в группах детей «Острый бронхит» и «Острая пневмония»

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

На рисунке 6 показано, что в группе детей «Острый бронхит» количество пациентов с соотношением концентраций КЖК, характерным для дисбиоза ротоглотки и присутствия респираторного вируса, статистически значимо больше, чем в группе детей «Острая пневмония». Полученные данные совпадают с интерпретацией результатов анализов концентраций КЖК в слюне и бактериологического исследования мазков из ротоглотки этих пациентов.

На следующем этапе изучали соотношение частот встречаемости микробиоценозов ротоглотки с бактериальной, вирусной и сочетанной (микст)-респираторной инфекцией в исследуемых группах детей. Результаты

представлены на рисунке 7.

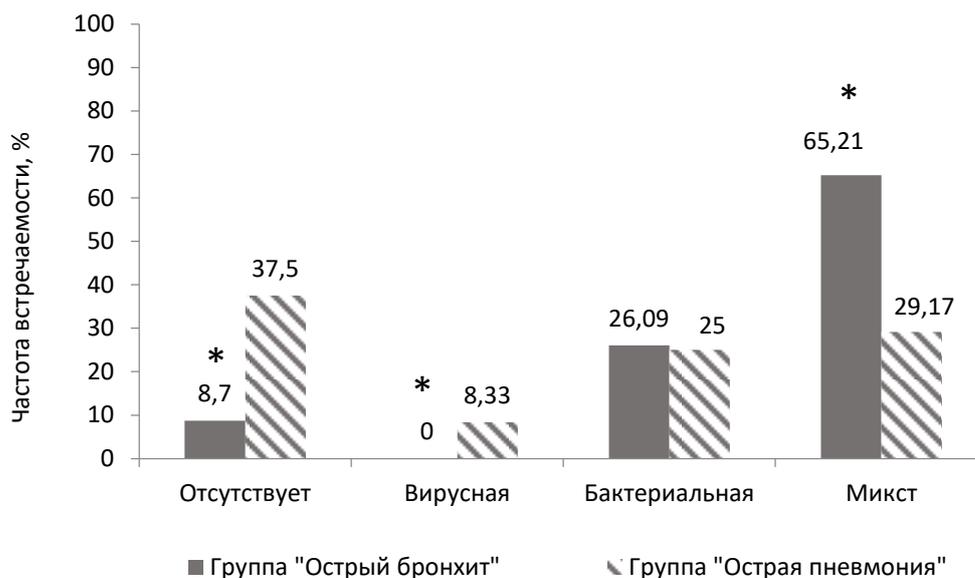


Рисунок 7 – Частоты встречаемости микробиоценозов с бактериальной, вирусной и сочетанной (микст)-респираторной инфекцией в группах детей «Острый бронхит» и «Острая пневмония»

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

На рисунке 7 показано, что в 8,7% случаев в группе детей «Острый бронхит» и в 37,5% в группе детей «Острая пневмония» отсутствует выраженное изменение функциональной активности микробиоценоза ротоглотки, характерное для дисбиотических изменений, в том числе связанных с присутствием респираторных вирусов. Пациенты из группы «Острый бронхит», в слюне которых определяется специфическое соотношение концентраций КЖК, характерное для вирусной инфекции (не считая микст-инфекции), не встречаются. Это указывает на то, что в группе детей «Острый бронхит» присутствие респираторного вируса всегда сопровождается дисбиотическими изменениями микробиоценоза ротоглотки, связанными с высокой бактериальной колонизацией (микст-инфекция).

Таким образом, с помощью метода микробиом-ассоциированной метабономики подтверждается усиление дисбиоза ротоглотки в присутствии

респираторного вируса.

3.2. Характеристика функционального состояния микробиоценоза ротоглотки у часто болеющих детей (по математическим моделям)

Для оценки статистической значимости различий функционального состояния микробиоценоза ротоглотки между группами часто болеющих - «ЧБД» и эпизодически болеющих детей - «ЭБД» сравнивали средние величины значений концентраций КЖК в слюне по U-критерию Манна-Уитни. Для оценки направленности изменений функционального состояния микробиоценоза ротоглотки определяли количество значений в выборке, которые укладываются в рамки референсных значений (Глава 2.2). Статистическую значимость отличий в группах определяли в соответствии с критерием Хи-квадрат. Параметры функциональной активности микробиоценоза ротоглотки для исследуемых групп представлены в таблице 23.

Таблица 23 – Функциональная активность микробиоценоза ротоглотки у детей в группах «ЧБД» и «ЭБД»

Показатели	Группа «ЧБД»	Группа «ЭБД»	Статистическая значимость $p < 0,05$
Концентрации КЖК в слюне средние (медианные значения с интерквартильным разбросом)			
Структурный индекс, ед	0,23 (0,15 - 0,31)	0,29 (0,2 - 0,38)	0,0081
Индекс изокилот, ед.	1,38 (0,74 - 2,22)	1,32 (0,77 - 1,81)	0,1143
Доля уксусной кислоты, %	87,01 (82,3 - 88,86)	84,02 (79,9 - 89,44)	0,1449
Доля пропионовой кислоты, %	11,27 (9,19 - 15,7)	12,09 (8,48 - 18,44)	0,2535
Доля масляной кислоты, %	1,66 (1,38 - 2,13)	1,89 (1,49 - 2,77)	0,3434

Примечание: полужирным курсивом отмечены значения, указывающие на статистически значимое отличие групп друг от друга, рассчитанно по U-критерию Манна-Уитни, $p < 0,05$

В таблице 23 показано, что функциональная активность микробиоценоза ротоглотки в исследуемых группах детей имеет статистически значимые различия для структурного индекса, характеризующего активность индигенной микрофлоры. В группе детей

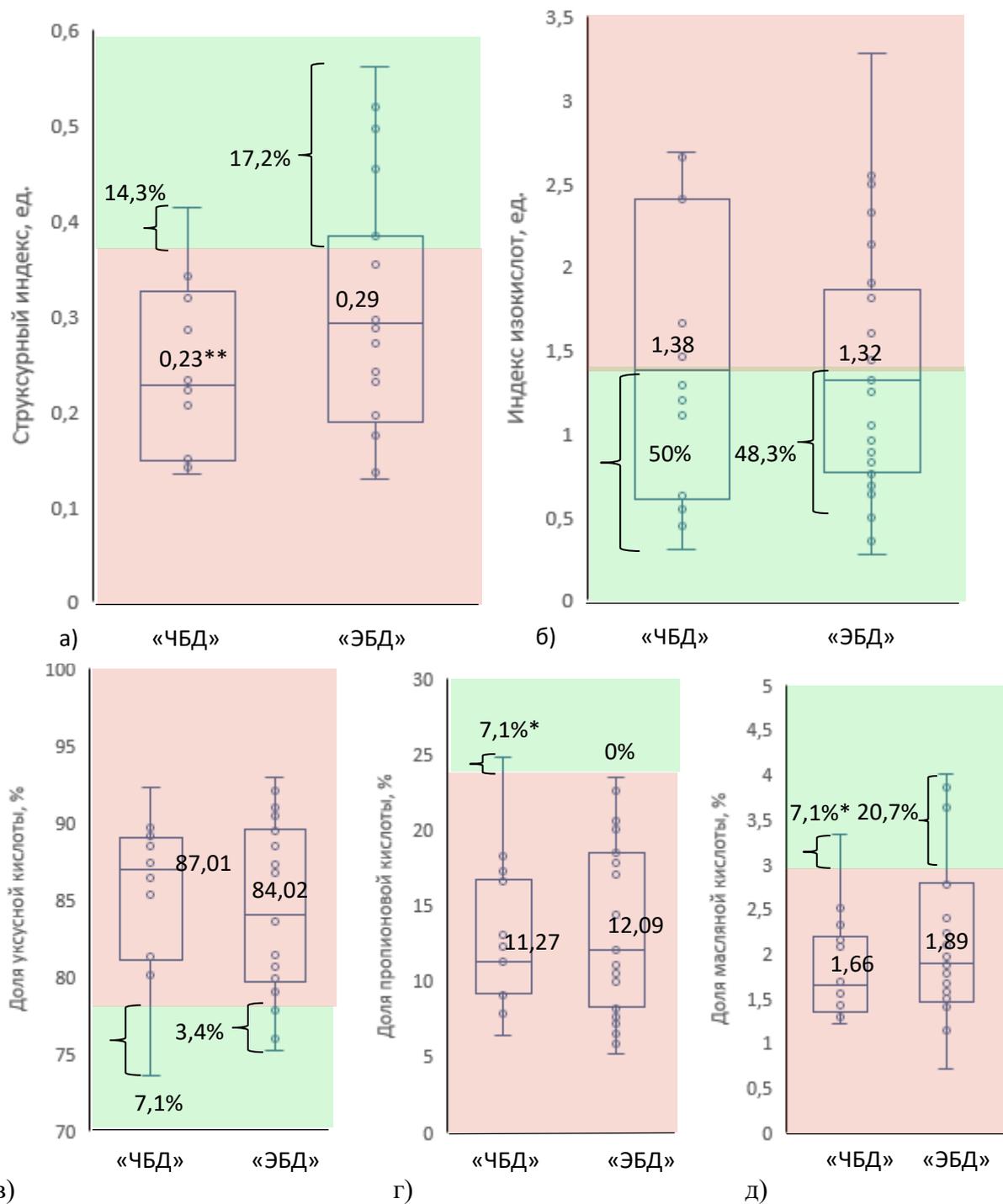
«ЧБД» значение структурного индекса ниже (0,23), чем в группе детей «ЭБД» (0,29). Для остальных показателей функциональной активности не отмечается статистически значимых отличий между группами.

Концентрации КЖК в слюне, критерии функциональной активности микробиоценоза ротоглотки в исследуемых группах и их частоты встречаемости, находящиеся в рамках референсных значений, представлены на рисунке 8 (а, б, в, г, д).

Полученные данные (Рисунок 8а) свидетельствуют, что среднее значение структурного индекса в группе детей «ЭБД» статистически значимо выше, чем в группе детей «ЧБД» (0,29 и 0,23 соответственно). Значения структурного индекса в группе детей «ЭБД» смещены в сторону нормальных значений. То есть в группе детей «ЧБД» снижена функциональная активность индигенной микрофлоры ротоглотки по сравнению с группой детей «ЭБД».

При оценке в исследуемых группах протеолитической активности микрофлоры ротоглотки статистически значимой разницы между средними значениями индекса изокилот, а также частотой встречаемости значений индекса изокилот в рамках референсных значений, не установлено (Рисунок 8б).

Анализ структуры метаболической активности показывает, что в исследуемых группах между средними значениями концентраций уксусной (Рисунок 8в), пропионовой (Рисунок 8г) и масляной кислот (Рисунок 8д) статистически значимая разница не наблюдается. При рассмотрении частот встречаемости исследуемых кислот в рамках референсных значений можно отметить, что доля пропионовой кислоты (Рисунок 8г) в группе детей «ЧБД» статистически значимо чаще в рамках референсных значений отмечается у 7,1%. Пропионовая кислота имеет бактериостатическое действие и может повлиять на увеличение проницаемости слизистой ротоглотки.



■ - показатели в рамках референсных значений ■ - показатели вне референсных значений

Рисунок 8 - Концентрации КЖК в слюне, критерии функциональной активности микробиоценоза ротоглотки у детей в группах «ЧБД» и «ЭБД» частоты их встречаемости, находящиеся в рамках референсных значений

Примечание: * - отмечено статистически значимое отличие частот встречаемости значений, находящихся в рамках референсных, между группами, рассчитанно по критерию согласия Пирсона (Chi-квaдрат), $p < 0,05$; ** - отмечена разница между средними значениями, указывающими на статистически значимое отличие групп друг от друга, рассчитанно по U-критерию Манна-Уитни, $p < 0,05$

Также в группе «ЧБД» наблюдается статистически значимое снижение количества детей с долей масляной кислоты в рамках референсных значений (7,1% в группе детей «ЧБД» по сравнению с 20,7% в группе детей «ЭБД») (Рисунок 8д). Снижение концентрации масляной кислоты и увеличение концентрации пропионовой кислоты в группе детей «ЧБД» указывает на подавление индигенной микрофлоры за счет снижения колонизационной резистентности и увеличения проницаемости слизистой ротоглотки.

Результаты бактериологического исследования мазков из ротоглотки представлены в таблице 24.

Таблица 24 – Бактериологическое исследование мазков из ротоглотки у детей в группах «ЧБД» и «ЭБД»

Микроорганизмы	Группа «ЧБД» (частота встречаемости, %; интенсивность обсемененности, lg)	Группа «ЭБД» (частота встречаемости, %; интенсивность обсемененности, lg)
<i>Streptococcus a-hem+</i>	100 (6)	100 (7)
<i>Staphylococcus aureus</i>	7 (5)	6 (4)
<i>Neisseria spp.</i>	87 (6)	93 (7)
<i>Klebsiella spp.</i>	13 (4,5)	16 (4)
<i>Pseudomonas spp.</i>	13(3,5) *	6 (5)
<i>Enterobacter spp.</i>	0	6 (4) *
<i>Candida spp.</i>	33 (4)	28 (4)

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

По данным, представленным в таблице 24, можно отметить, что статистически значимое увеличение частоты встречаемости в группе детей «ЧБД» отмечается для *Pseudomonas spp.* при интенсивности обсемененности 3,5 lg КОЕ/г (13% - в группе детей «ЧБД» и 6% - в группе детей «ЭБД»). Статистически значимое увеличение частоты встречаемости в группе детей «ЭБД» отмечается для *Enterobacter spp.* при интенсивности обсемененности 4 lg КОЕ/г (6% - в группе детей «ЭБД» и 0% - в группе детей «ЧБД»). В группах детей «ЭБД» и «ЧБД» отмечается присутствие представителей нормальной микрофлоры ротоглотки - *Streptococcus spp. α-hem⁺*, *Neisseria*

spp. в титре 6-7 lg КОЕ/г.

Таким образом, отличия видового состава микроорганизмов в группах «ЧБД» и «ЭБД» можно считать несущественными.

Методом молекулярно-генетического исследования мазков из зева и носа пациента определяли присутствие фрагмента ДНК/РНК респираторных вирусов. Частота встречаемости респираторных вирусов в мазках из зева и носа в группах детей «ЧБД» и «ЭБД» представлена в таблице 25.

Таблица 25 – Частота встречаемости респираторных вирусов в мазках из зева и носа у детей в группах «ЭБД» и «ЧБД»

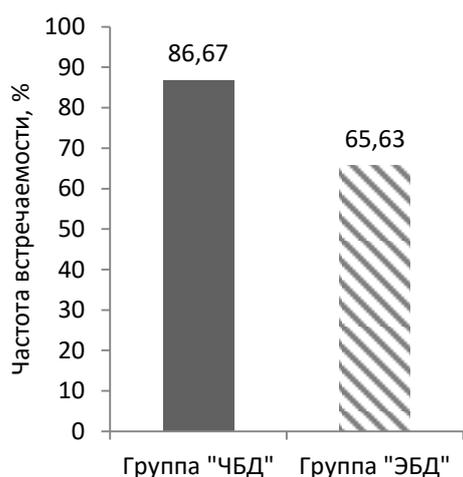
Вирусы	Частота встречаемости, %	
	Группа «ЧБД»	Группа «ЭБД»
<i>H.rhinovirus</i>	22 *	13
<i>H.metapneumovirus</i>	7	13
<i>Epstein-Barr virus</i>	7	3
<i>H.parainfluenza virus 1/3, 2/4</i>	0	3
<i>H.respiratory syncytial virus</i>	0	13 *
<i>I.virus B</i>	7 *	0
<i>H.adenovirus</i>	0	6 *
<i>I.virus A</i>	7	3

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

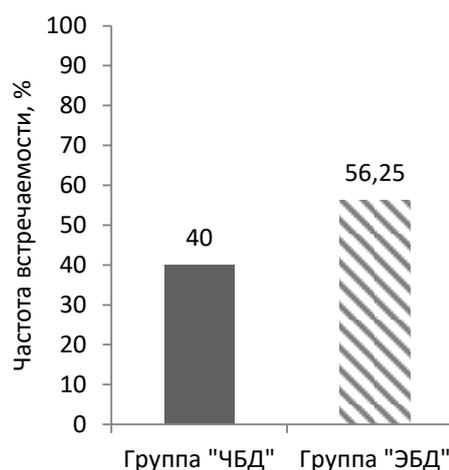
Из данных, представленных в таблице 25, следует, что в группе детей «ЧБД» статистически значимо чаще, чем в группе детей «ЭБД», выделяются ДНК *H.rhinovirus* (22%) и *I.virus B* (7%). В группе детей «ЭБД» статистически значимо чаще выделяется ДНК *H.respiratory syncytial virus* (13%) и *H.adenovirus* (6%).

Для интегральной оценки предиктивным анализом концентраций КЖК в слюне дисбиотических нарушений микробиоценоза ротоглотки, связанных с высокой бактериальной колонизацией и/или присутствием респираторного вируса сравнивали частоту встречаемости дисбиозов и присутствия респираторных вирусов в группах детей «ЧБД» и «ЭБД». Результаты сравнения представлены на рисунке 9. Частота встречаемости

микробиоценозов со специфическим соотношением метаболитов, которое характерно для дисбиотических состояний, в группах детей «ЧБД» и «ЭБД», представлена на рисунке 9а (модель «Дисбиоз»). Частота встречаемости микробиоценозов со специфическим соотношением метаболитов, которое характерно для присутствия в микробиоценозе респираторного вируса, в группах детей «ЧБД» и «ЭБД», представлена на рисунке 9б (модель «Вирус»).



а) модель «Дисбиоз»



б) модель «Вирус»

Рисунок 9 – Частоты встречаемости дисбиозов бактериальной и вирусной этиологии, рассчитанных по классификационным уравнениям моделей «Дисбиоз» и «Вирус» в группах детей «ЧБД» и «ЭБД»

На рисунке 9 показано, что разница в соотношениях концентраций КЖК, характерных для дисбиоза ротоглотки (Рисунок 9а) и присутствия респираторного вируса (Рисунок 9б), в исследуемых группах не имеет статистической значимости.

Изучали соотношение частот встречаемости микробиоценозов ротоглотки с бактериальной, вирусной и сочетанной (микст)-респираторной инфекцией в исследуемых группах детей. Результаты представлены на рисунке 10.

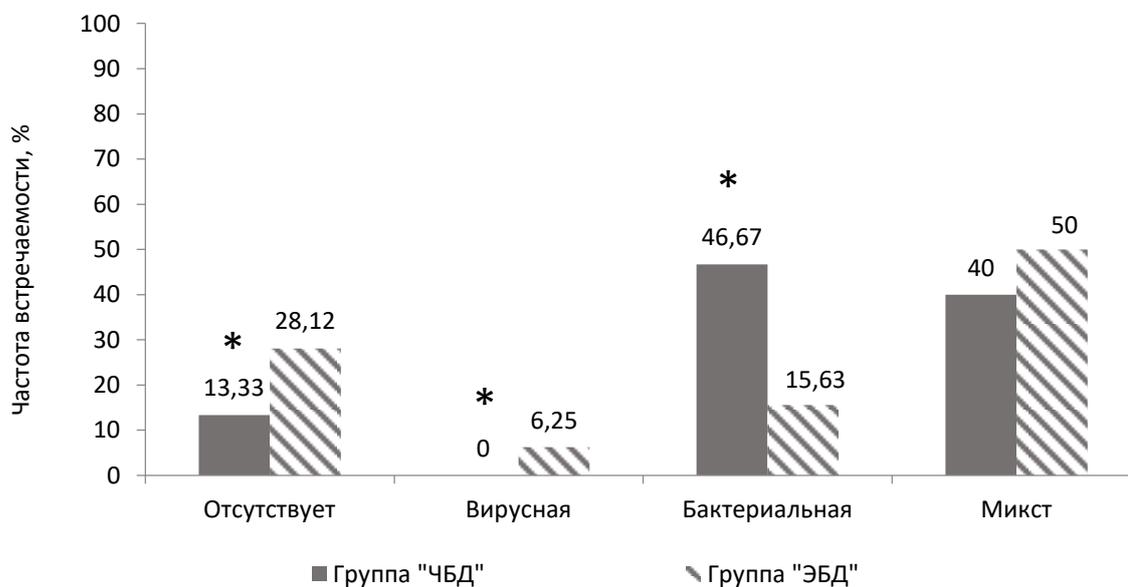


Рисунок 10 – Частоты встречаемости микробиоценозов с бактериальной, вирусной и сочетанной (микст)-респираторной инфекцией в группах детей «ЧБД» и «ЭБД»

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

На рисунке 10 показано, что в 13,33% случаев в группе детей «ЧБД» и в 28,12% в группе детей «ЭБД» отсутствует выраженное изменение функциональной активности микробиоценоза ротоглотки, характерное для дисбиотических изменений, в том числе связанных с присутствием респираторных вирусов. Пациенты, в микробиоценозах которых определяется специфическое соотношение концентраций КЖК в слюне, характерное для вирусной инфекции (не считая микст-инфекции) не встречаются в группе детей «ЧБД». Это указывает на то, что в группе детей «ЧБД» присутствие респираторного вируса всегда сопровождается дисбиотическими изменениями микробиоценоза ротоглотки, связанными с присутствием бактериального агента. Изменения функциональной активности микробиоценоза ротоглотки чаще сопровождают группу детей «ЧБД», если сравнивать с группой детей «ЭБД», по значениям в подгруппе «Бактериальная инфекция» (46,67% - для «ЧБД» и 28,12% - для «ЭБД»). Доля микст-инфекций в двух группах не имеет статистически значимых отличий.

Таким образом, можно отметить, что для детей из группы «ЧБД» респираторное заболевание проходит тяжелее, так как чаще встречается бактериальная инфекция, и вирусная инфекция всегда сопровождается бактериальной.

В этой же исследуемой когорте детей в возрасте от 7 до 14 лет, находящихся на стационарном лечении с диагнозами острый бронхит или острая внебольничная пневмония, сравнивали средние значения коэффициентов уникальности математических моделей «Дисбиоз» и «Вирус» для оценки влияния вида респираторного вируса на функциональную активность микробиоценоза ротоглотки.

Результаты, представленные в таблице 26, ранжированы по степени влияния на функциональную активность, связанную с наличием респираторного вируса (модель «Вирус»).

Таблица 26 – Коэффициент уникальности модели «Вирус» и «Дисбиоз» для различных ассоциаций респираторных вирусов

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

Из полученных данных (Таблица 26) следует, что значения коэффициента уникальности модели «Вирус» изменяются от 0,48 ед. до 0,974 ед. Наибольшее значение коэффициента уникальности 0,974 ед. определили для ассоциации *H.rhinovirus + Epstein-Barr virus*, что указывает на наиболее существенное влияние этой ассоциации вирусов на функциональную активность микробиоценоза ротоглотки. В исследуемой выборке не

встречались микробиоценозы с наличием *Epstein-Barr virus*, не имеющим ассоциаций с другими вирусами. Взаимодействие *Epstein-Barr virus* с другими респираторными вирусами усиливает его воздействие на функциональную активность микробиоценоза ротоглотки: *H.rhinovirus* – коэффициент уникальности равен 0,801, в ассоциации с *Epstein-Barr virus* — 0,974; *H.metapneumovirus* — 0,783, в ассоциации — 0,846. *H.adenovirus* также не встречался в исследуемой выборке без ассоциации с другими респираторными вирусами. Ассоциация респираторных вирусов с *H.adenovirus* ослабляет действие респираторного вируса на функциональную активность микробиоценоза ротоглотки: *H.metapneumovirus* — коэффициент уникальности равен 0,783, в ассоциации с *H.adenovirus* — 0,48.

Анализ значений коэффициента уникальности модели «Дисбиоз» показывает, что для всех респираторных вирусов и их сочетаний значение коэффициента уникальности модели «Дисбиоз» выше 0,5. То есть присутствие респираторного вируса в микробиоценозе всегда способствует изменению функционального состояния микробиоценоза, характерного для дисбиотических изменений микробиоценоза ротоглотки, связанных с высокой интенсивностью обсемененности ротоглотки микроорганизмами.

Заключение по главе

В главе определены особенности функциональной активности микробиоценоза ротоглотки в группах детей «Острый бронхит» и «Острая пневмония», а также в группах детей «ЭБД» и «ЧБД».

Бактериологическим методом и методом микробиом-ассоциированной метаболомики определена более высокая интенсивность обсемененности микроорганизмами и функциональная активность микробиоценоза ротоглотки в группе детей «Острый бронхит». Суммарная частота встречаемости респираторных вирусов в микробиоценозе ротоглотки также больше в группе пациентов «Острый бронхит». В этой группе отмечена особенность протекания респираторной инфекции вирусной этиологии. Она всегда сопровождается дисбиотическими изменениями бактериальной этиологии и представляет собой микст-инфекцию.

Группы детей «ЧБД» и «ЭБД» имеют менее выраженные отличия друг от друга по микробиологическим характеристикам, а также по наличию респираторных вирусов, чем группы детей «Острый бронхит» и «Острая пневмония». Статистическую значимость отличий групп детей «ЧБД» и «ЭБД» удастся выявить при использовании микробиом-ассоциированной метаболомики. В группе детей «ЧБД» чаще, чем в группе детей «ЭБД», встречается бактериальная инфекция, вызывающая более глубокие изменения метаболической активности в микробиоценозе ротоглотки.

Исследовано взаимодействие различных видов респираторных вирусов и оценена их метаболическая активность в различных сочетаниях. Показано, что ассоциация *Epstein-Barr virus* с другими респираторными вирусами усиливает функциональную активность других респираторных вирусов, а ассоциация *H.adenovirus* с другими респираторными вирусами меняет метаболический профиль микробиоценоза ротоглотки таким образом, что действие вируса ослабевает.

ГЛАВА 4. Разработка компьютерной программы интегральной оценки микробиоценоза ротоглотки у детей по концентрациям короткоцепочечных жирных кислот в слюне

Программа «Дисбиоз-скрин» предназначена для оценки функционального состояния микробиоценоза ротоглотки и предиктивного анализа состояния здоровья ребенка, в том числе в момент острой фазы респираторного заболевания. Исходными данными для предиктивного анализа являются концентрации уксусной, пропионовой, изомасляной, масляной, изовалериановой, валериановой, изокапроновой, капроновой кислот в слюне, которые определяются методом газо-жидкостной хроматографии. В результате предиктивного анализа определяются маркеры дисбиоза ротоглотки, связанного с высокой интенсивностью обсемененности ротоглотки, присутствием респираторного вируса и других нарушений, которые являются причиной частых повторных респираторных инфекций (часто болеющие дети - ЧБД). Программа реализована в 2 вариантах.

Первый вариант программы «Дисбиоз-скрин» написан в программной среде Microsoft Excel (версия 2007 года и выше).

Разработанный алгоритм компьютерной программы «Дисбиоз-скрин» представлен на рисунке 11.

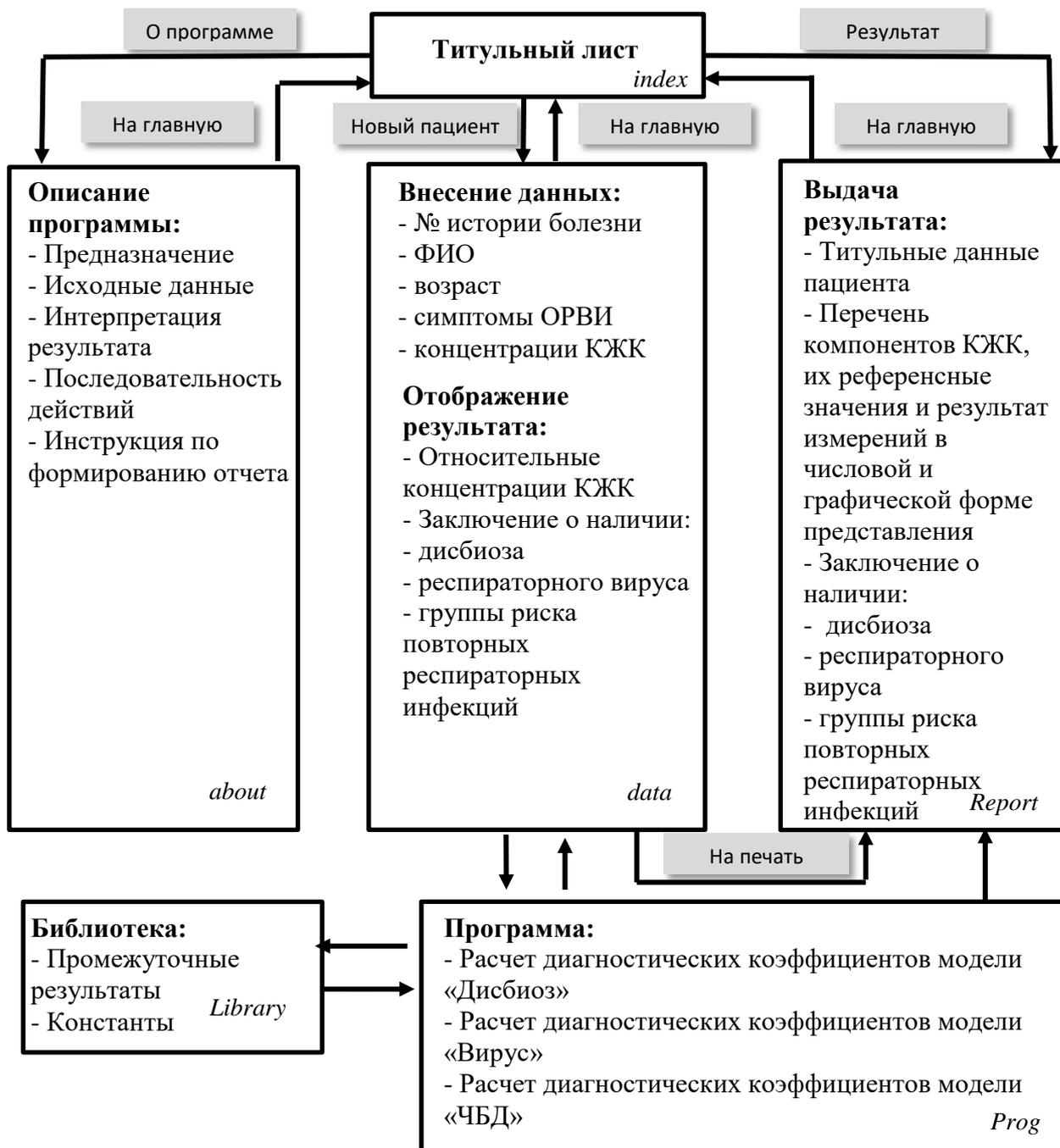


Рисунок 11 – Алгоритм компьютерной программы «Дисбиоз-скрин», написанной в программной среде Excel

Программа «Дисбиоз-скрин» имеет интерфейс, представленный на рисунках 12– 15.

На титульном листе (Рисунок 12), расположенном на вкладке Excel-файла «index», обозначено название программы, краткое описание и три кнопки навигации: «Новый пациент», «Результат» и «О программе».



Рисунок 12 – Титульный лист компьютерной программы «Дисбиоз-скрин»

Расчетные формулы расположены на вкладке Excel-файла «Prog», а переменные на вкладке «Library», которые скрыты от пользователей и не относятся к интерфейсу программы.

Кнопка «Новый пациент» содержит ссылку, которая отправляет на страницу заполнения данных о пациенте, расположенную на вкладке «data» (Рисунок 13).

Исходными данными для предиктивного анализа служат концентрации короткоцепочечных жирных кислот в слюне. Программа переводит концентрации КЖК в относительные концентрации, которые являются исходными переменными для расчетов по математическим моделям. Также проводится расчет суммарной концентрации кислот, структурного индекса и индекса изокилот. После внесения концентраций всех компонентов КЖК, в нижней части листа представляется прогноз в виде строки текста.

Дисбиоз - скрин



История болезни
 ФИО
 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	IC4	Изомасляной	ед.	0,019	
Масляной	ммоль/л	2,208863	C4	Масляной	ед.	0,034	
Изовалериановой	ммоль/л	0,618157	IC5	Изовалериановой	ед.	0,010	
Валериановой	ммоль/л	0,119356	C5	Валериановой	ед.	0,002	
Изокапроновой	ммоль/л	0,017241	IC6	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 изокислот	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 13 – Лист ввода первичных данных компьютерной программы «Дисбиоз-скрин»

Если согласно расчетам по классификационным уравнениям дискриминантного анализа определяется наличие дисбиоза ротоглоки, то выдается фраза: «Результаты биохимического анализа слюны указывают на присутствие маркеров дисбиоза ротоглотки»; если дисбиоз не выявился, то выдается фраза: «Результаты биохимического анализа слюны указывают на отсутствие маркеров дисбиоза ротоглотки».

Если согласно расчетам по классификационным уравнениям дискриминантного анализа выявляется соотношение относительных концентраций КЖК, специфическое для присутствия респираторного вируса, то выдается фраза: «Выявлены маркеры присутствия респираторного вируса»; в противном случае: «Не выявлены маркеры присутствия респираторного вируса».

Если согласно расчетам по классификационным уравнениям дискриминантного анализа выявляется соотношение относительных

концентраций КЖК, специфическое для когорты часто болеющие дети, то выдается фраза: «Соотношение концентраций короткоцепочечных жирных кислот в слюне указывает на состояние микробиоценоза ротоглотки специфического для когорты часто болеющие дети»; в противном случае: «Не выявлено состояние микробиоценоза ротоглотки специфического для когорты часто болеющие дети».

Кнопка «Результат» содержит ссылку, которая отправляет на страницу отчета о результатах расчета анализа пациента, расположенную на вкладке «Report» (Рисунок 14).

Для формирования протокола используется форма, которая содержит следующую информацию: относительные концентрации компонентов КЖК, суммарная концентрация, структурный индекс и индекс изокилот, указываются их референсные значения, выводится графическое изображение, указывающее на отношение измеренных величин к границам референсных значений. Заключение, сформированное по итогам расчета классификационных уравнений, выносится внизу страницы.



Результаты лабораторного исследования

Короткоцепочечные жирные кислоты в слюне		
Концентрации	Референсные значения	Пациент
Уксусной кислоты	[0-0,759]	0,602
Пропионовой кислоты	[0,239 - 1]	0,333
Изомасляной кислоты	[0,022 - 1]	0,019
Масляной кислоты	[0,028 - 1]	0,034
Изовалериановой кислоты	[0,003 - 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 изоакилат	[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 болеющие дети.

[На главную](#)

Рисунок 14 – Лист выдачи протокола исследования и заключения компьютерной программы «Дисбиоз-скрин»

Кнопка «О программе» содержит ссылку, которая отправляет на страницу описания программы, расположенную на вкладке «about» (Рисунок 15).

Для удобства пользователя на листе описания программы кратко изложена информация о предназначении программы и правилах ее использования.



Программа "Дисбиоз - скрин" предназначена для оценки функционального состояния микробиоценоза ротоглотки и предиктивного анализа состояния здоровья ребенка, в том числе в момент острой фазы респираторного заболевания. Исходными данными для предиктивного анализа являются концентрации уксусной, пропионовой, изомасляной, масляной, изовалериановой, валериановой, изокапроновой, капроновой кислот в слюне, которые определяются методом газожидкостной хроматографии. В результате предиктивного анализа определяются маркеры дисбиоза ротоглотки, связанного с высокой интенсивностью обсемененности ротоглотки, присутствием респираторного вируса и других нарушений, которые являются причиной частых повторных респираторных инфекций. Предикторы такого состояния у ребенка отличаются в состоянии клинической ремиссии и в острой фазе респираторного заболевания. Поэтому для получения корректного ответа предиктивного анализа следует указать наличие клинических проявлений острого респираторного заболевания. После внесения в программу результатов определения концентраций КЖК в слюне, рассчитывается соотношение концентраций КЖК, специфическое для каждого проявления дисбиоза ротоглотки, и выводится ответ. При нажатии кнопки на печать выводится протокол анализа, в котором указываются относительные концентрации КЖК в слюне и их сравнение с критическими значениями, а также информация о наличии биомаркеров дисбиоза ротоглотки.

Рисунок 15 – Описание компьютерной программы «Дисбиоз-скрин»

Второй вариант экспресс-программы «Disbios Screen Express» подготовлен в среде Visual Studio 2019 на языке Visual Basic и выполнен в виде одного окна (Рисунок 16).

При запуске программы Disbios Screen Express появляется окно для ввода концентраций КЖК пациента, определяемых в слюне методом газожидкостной хроматографии. В левом столбце необходимо внести концентрации восьми компонентов КЖК пациента и отметить галочкой наличие острого респираторного заболевания, если таковое имеется. После нажатия на кнопку «Ок» появляются расчетные индексы и концентрации компонентов КЖК, а также результат предиктивной диагностики: наличие дисбиоза ротоглотки, присутствие респираторного вируса или принадлежности к группе часто болеющих детей.

Рисунок 16 – Оформление программы Disbios Screen Express

Алгоритм программы Disbios Screen Express, выполненный на языке Visual Basic, представлен ниже:

Исходный текст программы Disbios Screen Express:

Public Class Form1

Private Sub Button1_Click(sender As Object, e As EventArgs) Handles Button1.Click

Dim C2, C3, C4, C5, C6, iC4, iC5, iC6, Summ, SI, II, pC2, pC3, pC4, pC5,
pC6, piC4, piC5, piC6, DiNorm, Disbios, VirNorm, Virus, RRINorm, RRI As
Double

Dim DisbiosText, VirusText, RRIText As String

C2 = TextBox1.Text

C3 = TextBox2.Text

iC4 = TextBox3.Text

C4 = TextBox4.Text

iC5 = TextBox5.Text

C5 = TextBox6.Text

iC6 = TextBox7.Text

C6 = TextBox8.Text

Summ = C2 + C3 + C4 + C5 + C6 + iC4 + iC5 + iC6

TextBox17.Text = Summ

SI = (C3 + C4 + C5 + C6 + iC4 + iC5 + iC6) / C2

TextBox18.Text = Format(SI, "0.00")

II = (iC4 + iC5 + iC6) / (C4 + C5 + C6)

TextBox19.Text = Format(II, "0.00")

pC2 = C2 / Summ

pC3 = C3 / Summ

piC4 = iC4 / Summ

pC4 = C4 / Summ

piC5 = iC5 / Summ

pC5 = C5 / Summ

piC6 = iC6 / Summ

pC6 = C6 / Summ

TextBox9.Text = Format(pC2, "0.00")

TextBox10.Text = Format(pC3, "0.00")

TextBox11.Text = Format(piC4, "0.000")

TextBox12.Text = Format(pC4, "0.00")

TextBox13.Text = Format(piC5, "0.000")

TextBox14.Text = Format(pC5, "0.000")

TextBox15.Text = Format(piC6, "0.000")

TextBox16.Text = Format(pC6, "0.000")

$Disbios = 12210.91 * pC2 + 11890.28 * pC3 + 13156.14 * piC4 + 12226.24 * pC4 + 42514.51 * pC6 - 6025.33$

$DiNorm = 12015.23 * pC2 + 11738.47 * pC3 + 12952.92 * piC4 + 12062.53 * pC4 + 41838.19 * pC6 - 5846.01$

If $Disbios > DiNorm$ Then $DisbiosText = \text{"Результаты биохимического анализа слюны указывают на присутствие маркеров дисбиоза ротоглотки."}$
Else $DisbiosText = \text{"Результаты биохимического анализа слюны указывают на отсутствие маркеров дисбиоза ротоглотки."}$

$TextBox20.Text = DisbiosText$

$Virus = -185.459 * piC6 + 883.891 * pC6 - 2.241$

$VirNorm = -2.8865 * piC6 + 427.7867 * pC6 - 1.8652$

If $Virus > VirNorm$ Then $VirusText = \text{"Выявлены маркеры присутствия респираторного вируса."}$ Else $VirusText = \text{"Не выявлены маркеры присутствия респираторного вируса."}$

$TextBox21.Text = VirusText$

If $CheckBox1.Checked = True$ Then

$RRI = 1368.494 * pC2 + 1538.684 * pC3 + 7103.325 * piC5 + 2165.619 * pC5 - 683.304$

$RRINorm = 1403.533 * pC2 + 1583.797 * pC3 + 7338.304 * piC5 + 2241.567 * pC5 - 719.622$

If $RRI > RRINorm$ Then $RRIText = \text{"Соотношение концентраций короткоцепочечных жирных кислот в слюне указывает на состояние микробиоценоза ротоглотки специфического для когорты часто болеющие дети."}$ Else $RRIText = \text{"Не выявлено состояние микробиоценоза ротоглотки специфического для когорты часто болеющие дети."}$

$TextBox22.Text = RRIText$

Else

$RRI = 48.2003 * piC4 - 5.8212 * pC4 + 49.1095 * piC5 + 369.9298 * pC6 - 2.4024$

$RRINorm = 129.961 * piC4 + 29.9281 * pC4 - 61.2817 * piC5 + 73.5953 * pC6 - 1.9865$

If $RRI > RRINorm$ Then $RRIText = \text{"Соотношение концентраций короткоцепочечных жирных кислот в слюне указывает на состояние микробиоценоза ротоглотки специфического для когорты часто болеющие"$

дети." Else RRIText = "Не выявлено состояние микробиоценоза ротоглотки специфического для когорты часто болеющие дети."

 TextBox22.Text = RRIText

End If

End Sub

End Class

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+».

Заключение

Острые инфекции верхних дыхательных путей множественной и неуточненной этиологии в течение длительного времени занимают первое рейтинговое место по показателям заболеваемости и экономическому ущербу. Наиболее пораженной группой населения являются дети, течение заболевания у которых нередко осложняется острым бронхитом и острой внебольничной пневмонией [61, 63]. В этой группе самыми уязвимыми являются часто и длительно болеющие дети, на долю которых приходится до 80% всей заболеваемости острыми респираторными инфекциями [92].

Лабораторная диагностика острых инфекций верхних дыхательных путей из-за большого числа этиологических агентов сложная, длительная и недостаточно отлаженная, что сказывается на своевременности и эффективности этиотропной терапии. Целью нашей работы было расширение возможностей оценки функционального состояния микробиоценоза ротоглотки детей, в том числе этиологической расшифровки острых респираторных заболеваний, методом микробиом-ассоциированной метаболомики, для обеспечения своевременности и эффективности профилактических и лечебных мероприятий.

Исследование проведено в 3 этапа.

На первом этапе 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. Полученные результаты соответствуют литературным данным о поэтапном формировании

микрофлоры ротовой полости человека [5, 108]. В соответствии с этими же данными статистически значимые 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 [2, 5]. Изменение состава микрофлоры в 14 лет связывают с завершением смены зубов, возрастными сдвигами гормонального фона и увеличением контактов в подростковом возрасте [174, 178].

Установлено, что структурный индекс и индекс изокислот являются наиболее чувствительными к изменениям структуры микробиоты ротоглотки:

- 1) функциональная активность индигенной микрофлоры ротоглотки (структурный индекс) увеличивается единожды в 14 лет в 1,1 раза;
- 2) снижение протеолитической активности микрофлоры ротоглотки с возрастом (индекс изокислот) происходит в 1,7 раза — в 4 месяца, и еще в 2,4 раза — в 14 лет;
- 3) средние значения соотношений уксусной, пропионовой, масляной кислот в слюне постоянны в 3-х временных интервалах: от 0 до 4 месяцев; от 4 месяцев до 14 лет; от 14 лет и старше;
- 4) 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;
- 5) 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;
- 6) 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.

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.

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 определяли методом математического моделирования (ROC-анализ) и оценивали как референсные, так как структурный индекс и индекс изокислот имеют очень высокие показатели прогностической значимости (AUC 0,966 и 0,812 соответственно). Для проведения ROC-анализа использовали 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 [60]. 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, 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.; изомасляной – 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.

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, использовали концентрации КЖК в слюне от пациентов, ограниченных этим возрастным интервалом [72].

При разработке математической модели «Дисбиоз» сравнивали относительные концентрации КЖК в слюне детей в возрасте от 4 месяцев до 14 лет из двух групп. В первую группу вошли дети с интенсивностью обсемененности ротоглотки условно-патогенной микрофлорой ниже $6 \lg$ КОЕ/г, а во вторую – выше $6 \lg$ КОЕ/г [61].

В математическую модель «Дисбиоз» методом пошагового исключения компонентов и анализом сопряженности были включены показатели относительных концентраций уксусной, пропионовой, изомасляной, масляной, капроновой кислот в слюне. В соответствии с коэффициентами уравнений, рассчитанными в программе Statistica 8.0, составлены дискриминантная функция, классификационные уравнения и

рассчитаны расстояния Махалобиса 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.

При разработке математической модели «Вирус» сравнивали относительные концентрации КЖК в слюне детей из двух групп. В первую 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. Во вторую группу вошли дети, в мазках которых ДНК/РНК вирусов не выделяли. 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 [155].

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

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 [4] были поделены на две группы (часто болеющие дети, эпизодически болеющие дети). Эти дети находились на стационарном лечении с диагнозами острый бронхит или острая внебольничная пневмония.

В математическую модель «ЧБД» методом пошагового исключения компонентов и анализом сопряженности были включены показатели относительных концентраций уксусной, пропионовой, изовалериановой и валериановой кислот в слюне детей. Получены дискриминантная функция, классификационные уравнения и рассчитаны расстояния Махалобиса для всех пациентов, участвующих в исследовании. Математическая модель «ЧБД» имеет 83,72% прогностической точности, при 82,35% специфичности и 88,89% чувствительности.

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 [4] были поделены на две группы (часто болеющие дети, эпизодически болеющие дети).

В математическую модель «ЧБД+» методом пошагового исключения компонентов и анализом сопряженности были включены показатели относительных концентраций: изомаляной, масляной, изовалериановой и капроновой кислот в слюне. Получены дискриминантная функция, классификационные уравнения и рассчитаны расстояния Махалобиса 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.

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 Махалобиса 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.

На втором этапе диссертационного 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 нами математических моделей для подтверждения прогностической ценности последних.

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 статистически значимое ($p < 0,05$) снижение структурного индекса ниже референсного значения - для детей из группы «Острый бронхит» в 95,4% случаев, для детей из группы «Острая пневмония» в 71,4% случаев, что может быть связано с большим подавлением функциональной активности индигенной микрофлоры ротоглотки у детей группы «Острый бронхит». У 95,5% детей из группы «Острый бронхит» в микробиоценозе ротоглотки была снижена доля масляной кислоты и у 100% - доля уксусной кислоты превышала референсное значение. Масляная кислота является энергосубстратом для эпителиоцитов. Ее дефицит приводит к нарушению проницаемости эпителия. Снижение концентрации масляной кислоты ниже референсного значения может быть причиной подавления функциональной активности индигенной микрофлоры и снижения колонизационной резистентности микробиоценоза ротоглотки пациентов при остром бронхите в большей степени, чем при острой внебольничной пневмонии [114, 173].

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. Полученные результаты коррелируют с результатами других научных исследований [114, 173].

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%) [77, 159, 166].

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».

Исследование частоты встречаемости специфического соотношения концентраций КЖК в слюне, характерного для дисбиоза ротоглотки бактериальной и/или вирусной этиологии по уже разработанным моделям показало, 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

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

У детей исследуемых нами групп также изучена частота встречаемости микробиоценозов ротоглотки, вызванных микст-инфекцией. Установлено, 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 нашей 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 [159].

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 [4] к группам часто и эпизодически болеющих детей («ЧБД», «ЭБД»).

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 для структурного индекса, характеризующего активность индигенной микрофлоры. У детей группы «ЧБД» он составил 0,23 ед., у детей группы «ЭБД» - 0,29 ед. Также установлено, что в группе детей «ЧБД» доля пропионовой кислоты в рамках референсных значений встречается статистически значимо чаще (на 7,1%). В этой же группе доля масляной кислоты в рамках референсных значений статистически значимо снижена (на 13,6%). Снижение концентрации

масляной кислоты и увеличение концентрации пропионовой кислоты в группе детей «ЧБД» указывает на подавление индигенной микрофлоры за счет снижения колонизационной резистентности и увеличения проницаемости слизистой ротоглотки.

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. α-hem⁺*, *Neisseria spp.* с интенсивностью обсемененности 6-7 lg КОЕ/г и статистически значимым ($p < 0,05$) увеличением частоты встречаемости *Enterobacter spp.* в группе «ЭБД» (на 6%), и *Pseudomonas spp.* в группе «ЧБД» (на 7%). Установлено, что видовой состав микроорганизмов в ротоглотке детей из групп «ЧБД» и «ЭБД», определяемый бактериологическим методом, имеет незначительные отличия, что подтверждается многочисленными исследованиями [4, 18, 39, 44, 48, 49, 68, 92].

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.

При изучении соотношения частот встречаемости микробиоценозов ротоглотки с бактериальной, вирусной и микст-инфекцией в исследуемых группах детей 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.

При изучении 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.

На третьем этапе была создана и запатентована компьютерная программа «Дисбиоз-скрин» для использования в сфере практического здравоохранения. 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 газожидкостной хроматографии. Программа переводит концентрации КЖК в относительные концентрации, которые являются исходными переменными для расчетов по математическим моделям. Устанавливаются относительные концентрации компонентов КЖК, их суммарная концентрация, структурный индекс и индекс изокилот, в результате чего 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. Данная информация может использоваться в клинической практике для предиктивной диагностики этиологии острых респираторных заболеваний, а также при скрининговых исследованиях функциональной активности микробиоценоза ротоглотки в детских коллективах, в том числе при их формировании, для проведения своевременной их коррекции в профилактических целях.

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 изокилот (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 сокращений

- ГЖХ — газо-жидкостная хроматография
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- КЖК — короткоцепочечные жирные кислоты
- КДЦ – клиничко-диагностический центр
- КОЕ – колонии образующие единицы
- КУ – коэффициент уникальности
- ЛДА – линейный дискриминантный анализ
- МAM - микробиом-ассоциированная метаболомика
- МРТ – магнитно-резонансная томография
- ОРВИ – острые респираторные вирусные инфекции
- ОРЗ — острые респираторные заболевания
- ПЦР - полимеразная цепная реакция
- ПЦР-РВ — полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- ЧБД — часто болеющие дети
- ЭБД – эпизодически болеющие дети
- ЯМР – ядерный магнитный резонанс
- 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
- TLR – толл подобные рецепторы

Список использованной литературы

1. Александрова, М.А. Пневмония как осложнение гриппа / М.А. Александрова, С.В. Яковлев // РМЖ. - 2006. - № 2. - С. 90.
2. Алешкин, В.А. Нарушения микробиоценозов у детей: Многоцентровое исследование. Сообщение I. Микробиоценоз и дисбактериоз ротоглотки у детей / В.А. Алешкин, Х.М. Галимзянов, С.С. Афанасьев, А.В. Караулов, О.В. Рубальский, Ю.В. Несвижский, Е.А. Воропаева, М.С. Афанасьев // Астраханский медицинский журнал. - 2010. – Т. 5, № 3. – С. 9–13.
3. Алешкин, В.А. Микробиоценозы открытых полостей и муконазальный иммунитет / В.А. Алешкин, С.С. Афанасьев, Е.А. Воропаева // Эффективная фармакотерапия. Аллергология и иммунология. - 2013. – Т. 27, № 2. - С. 6-11.
4. Альбицкий, В.Ю. Часто болеющие дети. Клинико-социальные аспекты. Пути оздоровления / В.Ю. Альбицкий, А.А. Баранов. – Саратов : Издательство Саратовского университета, 1986. - 45 с.
5. Анурова, А.Е. Влияние микрофлоры полости рта матерей на формирование микробиоценоза полости рта у детей с врожденными расщелинами верхней губы и неба / А.Е. Анурова, Э.В. Величко, Т.Ф. Косырева, Н.В. Стуров // Трудный пациент. - 2017. – Т. 15, № 1–2. – С. 59–63.
6. Ардатская, М.Д. Клиническое значение короткоцепочечных жирных кислот при патологии желудочно-кишечного тракта: автореф. дис. ... докт. мед. наук: 14.00.05 / Ардатская Мария Дмитриевна. – М., 2003. - 43 с.
7. Ардатская, М.Д. Дисбиоз (дисбактериоз) кишечника: современное состояние проблемы, комплексная диагностика и лечебная коррекция / М.Д. Ардатская, С.В. Бельмер, В.П. Добрица, С.М. Захаренко, Л.Б. Лазебник, О.Н. Минушкин, Л.С. Орешко, С.И. Ситкин, Е.И. Ткаченко, А.Н. Суворов, А.И. Хавкин, Б.А. Шендеров // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2015. – № 5. – С. 13–50.
8. Ахунова, А.М. Некоторые патогенетические механизмы развития бронхиальной астмы инфекционно-аллергической формы // Клиническая медицина. - 2000. - № 9. - С. 35-40.
9. Барышникова, Н.В. Дисбиоз кишечника - инфекция *Helicobacter pylori* - синдром раздраженного кишечника-метаболический синдром: что их

объединяет? / Н.В. Барышникова, Ю.А. Фоминых, Е.В. Балукова, Ю.П. Успенский // Практическая медицина. Гастроэнтерология. - 2012. – Т. 3, № 58. - С. 11-16.

10. Безродный, С.Л. Разработка метода микробиом-ассоциированной экспосомики для интегральной оценки нарушений липидного и углеводного обмена у лиц пожилого возраста: дис. ... канд. биол. наук: 1.5.11 / Безродный Святослав Леонидович. – М., 2022. – 156 с.

11. Белобородова, Н.В. Интеграция метаболизма человека и его микробиома при критических состояниях / Н.В. Белобородова // Общая реаниматология. - 2012. – Т. 8, № 4. – С. 42-54.

12. Белобородова, Н.В. Экзометаболиты некоторых анаэробных микроорганизмов микрофлоры человека / Н.В. Белобородова, И.Т. Байрамов, А.Ю. Оленин, Н.И. Федотчева // Биомедицинская химия. – 2011. – Т. 57, вып. 1. – С. 95–105.

13. Белобородова, Н.В. Микробный путь образования фенилкарбоновых кислот в организме человека / Н.В. Белобородова, А.С. Ходакова, И.Т. Байрамов, А.Ю. Оленин // Биохимия. – 2009. – Т. 74, вып. 12. – С. 1657–1663.

14. Белов, А.Б. Прошлое, настоящее и будущее пандемий гриппа. Взгляд эпидемиолога / А.Б. Белов, П.И. Огарков // Новости вакцинопрофилактики. Вакцинация (информационный бюллетень). - 2002. - № 4 (22). - С. 6-7.

15. Белоусов, Ю.Б. Клинико-эпидемиологическая оценка средств, применяемых для профилактики и лечения ОРВИ у детей // Ю.Б. Белоусов, О.И. Карпов, М.В. Леонова, О.В. Ефременкова // Детские инфекции. – 2006. - № 4. – С. 47-51.

16. Бондаренко, В.М. Дисбактериозы кишечника у взрослых / В.М. Бондаренко, Н.М. Грачева, Т.В. Мацулевич. – Москва : КМК Scientific Press, 2003. – 220 с.

17. Боровиков, В.П. STATISTICA: Статистический анализ и обработка данных в среде Windows / В.П. Боровиков, И.П. Боровиков. — Москва : Филинь, 1997. — 608 с.

18. Вакцинация детей с осложненным преморбидным фоном : учебное пособие / И.Б. Репина, Л.А. Галкина. – Москва : Издательство, 2015. - 28 с.

19. Вахитов, Т.Я. Концепция суперорганизма в биологии и медицине / Т.Я. Вахитов, С.И. Ситкин // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2014. – № 7(107). – С. 72–85.
20. Володин, Н.Н. Характеристика микроорганизмов, колонизирующих кишечник человека / Н.Н. Володин, В.М. Коршунов, Б.А. Ефимов, Л.И. Кафарская // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2002. - № 5. - С. 98 – 104.
21. Воропаева, Е.А. Микробная экология и гистаминообразующая активность микроорганизмов задней стенки глотки детей, больных бронхиальной астмой: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.09 / Воропаева Елена Александровна. – М., 2002. – 26 с.
22. Гаврилова, О.А. Микробный пейзаж полости рта у здоровых подростков и больных хроническим гастродуоденитом / О.А. Гаврилова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2008. - № 6. - С. 59-63.
23. Гендон, Ю.З. Можно ли прогнозировать гриппозные эпидемии и пандемии? / Ю.З. Гендон // Новости вакцинопрофилактики. Вакцинация (информационный бюллетень). - 2002. - № 4 (22). - С. 4-5.
24. Грипп : руководство для врачей / Г.И. Карпучин. – Санкт-Петербург : Гиппократ, 2001. - 360 с.
25. Гудима, И.А. Микробные биоценозы при гипертрофии лимфоидного кольца и хроническом тонзиллите у детей: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.09 / Гудима Ирина Александровна. – Ростов-на-Дону, 2002. – 25 с.
26. Дисбиоз кишечника : руководство по диагностике и лечению / Ткаченко Е.И., Суворова А.Н. – Санкт-Петербург : ИнформМед, 2013. – 282 с.
27. Зайков, С.В. Иммуотропные свойства пробиотиков / С.В. Зайков // Здоровье Украины. Гастроэнтерология. - 2013. - № 4. - С. 35-37.
28. Заплатников, А.Л. Рибосомальная иммунопрофилактика острых и рекуррентных респираторных инфекций у детей / А.Л. Заплатников, А.А. Гирина, Н.А. Коровина, Н.С. Глухарева // Фарматека. - 2015. - № 1. – С. 34–39.
29. Заплатников, А.Л. Клинико-патогенетическое обоснование иммунотерапии и иммунопрофилактики вирусных и бактериальных

заболеваний у детей: автореф. дис. ... докт. мед. наук: 14.00.33 / Заплатников Андрей Леонидович. – М., 2003.- 42 с.

30. Затевалов, А.М. Интегральная оценка состояния микробиоценозов биотопов желудочно-кишечного тракта и методы коррекции их нарушений: дис. ... д-ра биол. наук: 03.01.06, 03.02.03 / Затевалов Александр Михайлович. – М., 2016. – 215 с.

31. Затевалов, А.М. Определение критической для функциональной активности нормальной микрофлоры кишечника и ротоглотки величины концентрации масляной кислоты в кале пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии, находящихся на зондовом питании / А.М. Затевалов, В.А. Алешкин, Е.П. Селькова, Т.А. Гренкова // *Фундаментальная и клиническая медицина.* - 2017. – Т. 2, № 1. - С. 14-22.

32. Ибрагимов, Т.И. Обоснование выбора материала несъемных зубных протезов для больных сахарным диабетом / Т.И. Ибрагимов, А.Ю. Нурмагомедов, О.А. Кондракова, А.М. Затевалов, А.И. Лебеденко, С.Д. Арутюнов // *Институт стоматологии.* - 2001. – № 4 (В). - С. 125.

33. Киселев, О.И. Грипп и другие респираторные вирусные инфекции: эпидемиология, профилактика, диагностика и терапия / О.И. Киселев, И.Г. Маринич, А.А. Соминина // Санкт-Петербург : Боргес, 2003. - 244 с.

34. Киселев, О.И. Основные итоги научных разработок по проблеме «Грипп, гриппоподобные заболевания, их профилактика и лечение» и рекомендации по внедрению в практику здравоохранения» / О.И. Киселев, А.А. Соминина, И.Г. Маринич // Тезисы Юбилейной международной научной конференции «Грипп-XXI век». – Санкт-Петербург, 10-11 ноября 1997. - С. 4-9.

35. Клинико-лабораторная эффективность применения отечественного комбинированного пробиотика «Флорин форте» в комплексном лечении детей с инфекционной респираторной патологией и при острых кишечных инфекциях : учебное пособие / Л.В. Феклисова, Е.Е. Целипанова, Е.Р. Мескина, Л.А. Галкина. – Москва : ГБУЗ МО МОНКИ, 2011. - 19 с.

36. Клинико-лабораторная характеристика воспалительных изменений ротоглотки при острой респираторной патологии : пособие для врачей / Л.В. Феклисова, Е.Е. Целипанова. - Москва : ГБУЗ МО МОНКИ,

2010. – 24 с.

37. Колобухина, Л.В. Клиника и лечение гриппа / Л.В. Колобухина // РМЖ. – 2001. - № 9. – С. 16–17.

38. Колоколова, Т.Н. Метаболический анализ биологических жидкостей человека с помощью спектроскопии ЯМР ^1H (обзор) / Т.Н. Колоколова, О.Ю. Савельев, Н.М. Сергеев // Журнал аналитической химии. - 2008. – Том 63, № 2. - С. 118—136.

39. Коровина, Н.А. Современные возможности эффективной иммунопрофилактики острых респираторных инфекций в программах оздоровления часто болеющих детей / Н.А. Коровина, А.Л. Заплатников, И.В. Леписева, А.В. Суздальников, А.А. Гирина // Детские инфекции. - 2011. – Т. 10, № 1. – С. 56–59.

40. Кузнецов, О.К. Условия, способствующие появлению вируса гриппа с пандемическими потенциями. Профилактические меры / О.К. Кузнецов // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2003. - № 3(10). - С. 5 - 12.

41. Кузнецов, О.К. Популяционный иммунитет к сезонному гриппу как основной фактор, ограничивающий глобальную эпидемию 2009-2010 годов А(Н1N1) / О.К. Кузнецов, Л.А. Степанова, А.А. Чурикова // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. - 2010. - № 4 (53). - С. 9-17.

42. Лахтин, М.В. Кофункционирование защитных систем: мукозальный иммунитет и система комплемента человека / М.В. Лахтин, В.М. Лахтин, С.С. Афанасьев, В.А. Алешкин // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук.- 2015. -№ 5. - С. 113-122.

43. Лохов, П.Г. Масс-спектрометрические методы в метаболомике / П.Г. Лохов, А.И. Арчаков // Биомедицинская химия. – 2008. – Т. 54, вып. 5. – С. 497–511.

44. Лутовина, О.В. Роль дисбиозов кишечника и ротоглотки в формировании контингента часто и длительно болеющих респираторными заболеваниями детей раннего возраста: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.09 / Лутовина Ольга Васильевна. - Ростов-на -Дону, 2009. - 24с.

45. Лыткина, И.Н. Анализ заболеваемости гриппом и другими респираторными инфекциями по Москве в эпидсезон 2009-2010 гг. // И.Н. Лыткина // Еженедельный информационный бюллетень Роспотребнадзора. –

2010. - № 10. – С. 22-26.

46. Львов, Д.К. Изоляция 24.05.2009 и депонирование в Государственную коллекцию вирусов (ГКВ № 2452 от 24.05.2009) первого штамма А/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)swl, подобного свиному вирусу А(H1N1) от первого выявленного 21.05.2009 больного в Москве / Д.К. Львов, Е.И. Бурцева, А.Г. Прилипов // Вопросы вирусологии. – 2009. - № 5. – С. 10-14.

47. Львов, Н.И. Грипп и другие острые респираторные заболевания: клиника, диагностика и лечение / Н.И. Львов // Медлайн-экспресс. – 2009. – № 6 (204). – С. 52–56.

48. Мамаева, М.А. Часто болеющие дети : программа обследования, лечения и оздоровления: пособие для врачей педиатров / М.А. Мамаева. – Санкт-Петербург : Издательский Дом Стелла, 2011. - 60 с.

49. Макарова, З.С. Часто болеющие дети и их реабилитация в условиях детской поликлиники / З.С. Макарова // Поликлиника. – 2005. – №. 1. – С. 9-16

50. Максимов, В.И. Кислотность кишечника как защитный фактор организма хозяина / В.И. Максимов, В.Е. Родоман // Журнал микробиология. - 1998. - № 4. - С. 96 - 101.

51. Максимов, С.А. Риски и их оценка в медико-биологических исследованиях / С.А. Максимов, С.Ф. Зинчук, Е.А. Давыдова. – Кемерово : Кемеровская государственная медицинская академия, 2010. – 10 с.

52. Манылов, И.В. Оценка точности распознавания классов при автоматизированной обработке аэрофотоснимков / И.В. Манылов // Известия вузов. Приборостроение. - 2011. – Т. 54, № 5. - С. 35-39.

53. Маринич, И.Г. Закономерности эпидемического процесса при гриппе и других ОРВИ с 1986 по 2008 гг. и совершенствование системы эпидемиологического надзора за гриппом / И.Г. Мариныч. - Санкт-Петербург : ГУ НИИ гриппа Северо-Западное отделение РАМН, 2008. - 16 с.

54. Маянский, А.Н. Клинические аспекты фагоцитоза / А.Н. Маянский, О.И. Пикуза. – Казань : Магариф, 1993. – 192 с.

55. Медведева, Е.А. Метаболическая активность микрофлоры ротоглотки у детей с бронхитом и внебольничной пневмонией / Е.А. Медведева, Е.Р. Мескина // Альманах клинической медицины. - 2015. - № 42. - С. 72-78.

56. Мескина, Е.Р. Оптимизация тактики применения иммунобиологических препаратов в лечении острых кишечных инфекций у детей: автореф. дис. ... докт. мед. наук: 14.01.09 / Мескина Елена Руслановна. – М., 2013. - 48 с.
57. Мескина Е.Р. Методы диагностики нарушения микрофлоры кишечника / Е.Р. Мескина // Справочник заведующего КДЛ. - 2013.- № 10. - С. 14-20.
58. Метельская, В.А. Характер колонизационной резистентности слизистых оболочек дыхательного тракта при бронхитах у детей: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 14.03.09 / Метельская Валерия Алексеевна. – М., 2013. – 24 с.
59. Методическое пособие. Диагностика и лечение острых респираторных заболеваний / К.В. Жданов, С.М. Захаренко, В.П. Лихопоев, Н.И. Львов. – Санкт-Петербург : ВМедА, 2012. – 21 с.
60. Микробиоценозы и здоровье человека : руководство для врачей / В.А. Алешкин, С.С. Афанасьев, А.В. Караулов. – Москва : Издательство Династия, 2015. - 548 с.
61. Микроэкология и гуморальный иммунитет слизистых открытых полостей человека в норме и при патологических состояниях : учебное пособие для системы послевузовского профессионального образования врачей / В.В. Зверев, Ю.В. Несвижский, Е.А. Воропаева, С.С. Афанасьев. – Астрахань – Москва : АГМА, 2011. – 80 с.
62. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году : Государственный доклад // Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2021. – 256 с.
63. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2021 году : Государственный доклад // Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2022. – 340 с.
64. Об итогах распространения гриппа и ОРВИ в мире и Российской Федерации в эпидсезон 2012-2013 гг. и прогнозе на эпидсезон 2013-2014 гг. № 01/7080-13-32 от 24 июня 2013 года // Консультант плюс : справочная правовая система. – Москва, 2013.
65. Об утверждении отраслевого стандарта «Протокол ведения

больных. Дисбактериоз кишечника» : Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 231 от 9 июня 2003 года // Консультант плюс : справочная правовая система. – Москва, 2003.

66. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений : Приказ Министерства здравоохранения СССР № 535 от 22 апреля 1985 года // Консультант плюс : справочная правовая система. – Москва, 1985.

67. Об организации мероприятий по профилактике гриппа и острых респираторных вирусных инфекций в эпидсезон 2010-2011 гг. : Приказ Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по городу Москве № 104 от 01 сентября 2010 года // Консультант плюс : справочная правовая система. – Москва, 2010.

68. Овсянников, Д.Ю. Часто болеющие дети: что еще кроме инфекций? / Д.Ю. Овсянников, Т.Ю. Илларионова, Л.В. Пушко, Л.Г. Кузьменко // Вопросы современной педиатрии. - 2013. – Т. 12, № 1. - С. 74-86.

69. Онищенко, Г.Г. Итоги эпидсезона 2004-2005 гг. по гриппу и ОРВИ и прогноз на 2005-2006 гг. / Г.Г. Онищенко // Медицинская кафедра. - 2005. - № 4(16). - С. 8-15.

70. Острые респираторные заболевания у детей: лечение и профилактика. Научно-практическая программа // Союз педиатров России. – Москва : Издательство, 2002. – 69 с.

71. Патент 2219944 Российская Федерация, МПК А61К 38/21, А61Р 11/00. Способ лечения вирусно-бактериальных инфекций у детей / Л.В. Феклисова, Е.Р. Мескина, В.М. Щебекова, А.И. Покатилова, Л.А. Галкина, Е.Е. Целипанова, И.Б. Репина, В.А. Алешкин, С.С. Афанасьев; заявитель и патентообладатель: Московский областной научно-исследовательский клинический институт. - № 2002107923/14; заявл. 29.03.2002; опубл. 27.12.2003. Бюл. № 11 – 5 с.

72. Прикладная медицинская статистика : учебное пособие / В.М. Зайцев, В.Г. Лифляндский, В.И. Маринкин. – Санкт-Петербург : ООО «Издательство Фолиант», 2006. – 432 с.

73. Рациональная фармакотерапия ЧБД : руководство для врачей /

М.Г. Романцев. – Москва : Гэотар-медиа, 2009. – 352 с.

74. Рябинова, Е.Л. Клинико-иммунологическая диагностика и лечение детей с хроническим тонзиллитом комплексной формы: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.10 / Рябинова Елена Львовна. – М., 2010. – 24 с.

75. Рязанцев, С.В. Роль слизистой оболочки в защите ЛОР-органов от потенциально патогенных для организма антигенных факторов. / С.В. Рязанцев, Н.М. Хмельницкая, Е.В. Тырнова // Вестник оториноларингологии. - 2000. - № 3. - С. 60 - 64.

76. Савицкая, Н.А. Диагностика и характеристика оппортунистических инфекций у часто болеющих детей при острых респираторных заболеваниях: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.10 / Савицкая Наталья Александровна. – М., 2007. – 24 с.

77. Самсыгина, Г.А. Инфекции респираторного тракта у детей раннего возраста / Г.А. Самсыгина. – Москва : Миклош, 2006. – 279 с.

78. Ситкин, С.И. Метаболический дисбиоз кишечника и его биомаркеры / С.И. Ситкин, Е.И. Ткаченко, Т.Я. Вахитов // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2015. – № 12 (123). – С. 3–12.

79. Ситкин, С.И. Филометаболическое ядро микробиоты кишечника / С.И. Ситкин С.И, Е.И. Ткаченко, Т.Я. Вахитов // Альманах клинической медицины. - 2015. - № 40. - С. 12-34.

80. Слепушкин, А.Н. Современные особенности эпидемиологии и профилактики гриппа / А.Н. Слепушкин // Журнал микробиология. - 2001. - № 1. - С. 95–99.

81. Соминина, А.А. Этиологический мониторинг за гриппом и другими ОРЗ в России в сезон 2003-2004 годов / А.А. Соминина, О.И. Киселев, И.Г. Маринич, Л.С. Карпова, Е.А. Смородинцева // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. - 2004. - № 6(19). - С. 5-11.

82. Трухачева, Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica / Н.В. Трухачева. – Москва : Гэотар-медиа, 2013. – 384 с.

83. Урсова, И.Н. Значение грудного вскармливания для роста и развития младенцев / И.Н. Урсова // Альманах клинической медицины. – 2015. - № 42. – С. 23-37.

84. Урсова, Н.И. Иммунологическая функция интестинальной

микрофлоры, ее нарушения и возможности коррекции / Н.И. Урсова // Альманах клинической медицины. - 2015. - № 40. - С. 35-47.

85. Усвятцов, Б.Я. Характеристика микробного биоценоза слизистой носа у здоровых людей и стафилококковых бактерионосителей / Б.Я. Усвятцов, Л.И. Паршута, О.В. Бухарин // Журнал микробиология. – 2002. - № 6. – С. 65 - 69.

86. Хавкин, А.И. Влияние пребиотиков на иммунную систему / А.И. Хавкин // Эффективная фармакотерапия. - Педиатрия. - 2014. - № 4. - С. 34-40.

87. Хавкин, А.И. Микрофлора и развитие иммунной системы / А.И. Хавкин // Вопросы современной педиатрии. - 2012. – Т. 11, № 3. - С. 86-89.

88. Хавкин, А.И. Продукты метаболизма кишечной микрофлоры: возможна ли избирательная коррекция? / А.И. Хавкин, О.Н. Комарова // Вопросы современной педиатрии. - 2015. – Т. 14, № 2. - С. 212-218.

89. Хетагуров, В.В. Использование гелеобразного заменителя слюны при ортопедическом лечении больных с ксеростомией / В.В. Хетагуров, И.Ю. Лебедеенко, З.С. Есенова, Е.А. Воропаева, О.А. Кондракова, А.М. Затевалов // Панорама ортопедической стоматологии. - 2001. - С. 46.

90. Хлынина, Ю.О. Характеристика микробной популяции на слизистых оболочках ротоглотки у часто болеющих детей / Ю.О. Хлынина, Л.В. Крамарь // Актуальные вопросы инфекционной патологии и вакцинопрофилактики : материалы X Конгресса детских инфекционистов России. — Москва : Ассоциация педиатров-инфекционистов, 2011. — С. 118-119.

91. Хронический бронхит. Болезни органов дыхания : руководство по внутренним болезням / Н.Р. Палеев. – Москва : Медицина, 2000. – 350 с.

92. Часто болеющие дети : учебное пособие / С.А. Ляликов, И.М. Лысенко, И.В. Сарвилина; под общ. ред. М.Г. Романцева, И.Ю. Мельниковой. – Санкт-Петербург : ГБОУ ВПО «Северо-западный Государственный Медицинский Университет им. И.И. Мечникова, 2013. – 36 с.

93. Шендеров, Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. В 3 томах. Т. 1 / Б.А. Шендеров. – Москва : Грантъ, 1998. - 288 с.

94. Шендеров, Б.А. Медицинская микробная экология и

функциональное питание. В 3 томах. Т. 2 / Б.А. Шендеров. - Москва : Грантъ, - 1998. - 420 с.

95. Экспресс-метод биохимической оценки микрoэкологических и функциональных нарушений кишечника методом газо-жидкостной хроматографии: методические рекомендации / В.Н. Бабин, А.В. Дубинин, А.М. Затевалов, Н.С. Иконников, Е.А. Грубова, М.П. Гусарова, Е.А. Воропаева, Н.К. Кошкина - Москва : ООО НИФ «Ультрасан», 2000. – 17 с.

96. Ясинский, А.А. Сезонность эпидемического подъема заболеваемости гриппом в России в 2006-2008 гг. / А.А. Ясинский // Новости вакцинопрофилактики. Вакцинация (информационный бюллетень). - 2008. - № 4(54). - С. 3-5.

97. Agren, K. What is wrong in chronic adenoiditis / tonsillitis immunological factor. *Clinical Bacteriology* / K. Agren, K. Lindberg, A. Samulesson // *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* - 1999. – Vol. 1. - P. 137—139.

98. Aliprantis, A.O. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2 / A.O. Aliprantis, R.B. Yang, M.R. Mark, S. Suggett, B. Devaux // *Science.* - 1999. – Vol. 285. - P. 9-736.

99. Aluwong, T. Volatile fatty acids production in ruminants and the role of monocarboxylate transporters: A review / T. Aluwong, P.I. Kobo, A. Abdullahi // *African Journal of Biotechnology.* - 2010. - Vol. 9. - P. 6229-6232.

100. Atiomo, W. Metabolomic biomarkers in women with polycystic ovary syndrome: a pilot study / W. Atiomo, C.A. Daykin // *Mol. Hum. Reprod.* – 2012. – Vol. 18, No. 11. – P. 546–553.

101. Baskind, N.E. Understanding subfertility at a molecular level in the female through the application of nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy / N.E. Baskind, C. McRae, V. Sharma, J. Fisher // *Hum. Reprod. Update.* – 2011. – Vol. 17, No. 2. – P. 228–241.

102. Bassis, C.M. Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals / C.M. Bassis, J.R. Erb-Downward, R.P. Dickson, C.M. Freeman, T.M. Schmidt, V.B. Young, J.M. Beck, J.L. Curtis, G.B. Huffnagle, J.A. // *MBio.* – 2015. – Vol. 6, No. 2. – P. 2-10.

103. Beloborodova, N. Effect of phenolic acids of microbial origin on production of reactive oxygen species in mitochondria and neutrophils / N. Beloborodova, I. Bairamov, A. Olenin // *J. Biomed. Sci.* – 2012. – Vol. 19. – P. 89.

104. Berni, C.R. Specific Signatures of the Gut Microbiota and Increased

Levels of Butyrate in Children Treated with Fermented Cow's Milk Containing Heat-Killed *Lactobacillus paracasei* CBA L74 / R. Berni Canani, F. De Filippis, R. Nocerino, M. Laiola, L. Paparo, A. Calignano, C. De Caro, L. Coretti, L. Chiariotti, J.A. Gilbert, D. Ercolini // *Appl Environ Microbiol.* – 2017. - Vol. 83, No. 19. – P. 2-10.

105. Besten, G. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism / G. Besten, K. van Eunen, A.K. Groen, K. Venema, D.J. Reijngoud, B.M. Bakker // *Journal of Lipid Research.* - 2013. - Vol. 54. - P. 2325-2340.

106. Bitar, M.A. The role of OM85 BV (Broncho-Vaxom) in preventing recurrent acute tonsillitis in children / M.A. Bitar, R. Saade // *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* – 2013. - Vol. 77, № 5. - P. 670-673.

107. Bogdanov, M. Metabolomic profiling to develop blood biomarkers for Parkinson's disease / M. Bogdanov, W.R. Matson, L.Wang // *Brain.* – 2008. – Vol. 131, No. 2. – P. 389–396.

108. Bozzetto, S. Metabolomic profile of children with recurrent respiratory infections / S. Bozzetto, P. Pirillo, S. Carraro, M. Berardi, L. Cesca, M. Stocchero, G. Giordano, S. Zanconato, E. Baraldi // *Pharmacol Res.* - 2016. – Vol. 115. – P. 162-167.

109. Brown, R.L. Microbiota and resistance to infection / R.L. Brown, T.B. Clarke // *J. Immunology.* - Immunology Published by John Wiley & Sons Ltd., 2016. - P. 1-6.

110. Carvalho, R.A. Hepatic gluconeogenesis and Krebs cycle fluxes in a CC14 model of acute liver failure / R.A. Carvalho, J.G. Jones, C. McGuirk, A.D. Sherry, C.R. Malloy // *NMR Biomed.* - 2002. – Vol. 15, No. 1. - P. 45—51.

111. Cullen, T.W. Gut microbiota. Antimicrobial peptide resistance mediates resilience of prominent gut commensals during inflammation / T.W. Cullen, W.B. Schofield, N.A. Barry, E.E. Putnam, E.A. Rundell, M.S. Trent, P.H. Degan, C.J. Booth, H. Yu, A.L. Goodman // *Science.* – 2015. - Vol. 347, No. 6218. - P. 170–175.

112. Cheng, Y. Distinct urinary metabolic profile of human colorectal cancer / Y. Cheng, G. Xie, T. Chen // *J. Proteome Res.* – 2012. – Vol. 11, No. 2. – P. 1354–1363.

113. Daele, J. Humoral immunodeficiency in recurrent upper respiratory tract infections. Some basic, clinical and therapeutic features / J. Daele, A.F.

Zicot// Act. Otorhinolaryngol. Belg. – 2000. - Vol. 54, No. 3 - P. 373-390.

114. De Steenhuijsen Piters, W.A. Dysbiosis of upper respiratory tract microbiota in elderly pneumonia patients / W.A. De Steenhuijsen Piters, E.G. Huijskens, A.L. Wyllie, G. Biesbroek, M.R. van den Bergh, R.H. Veenhoven, X. Wang, K. Trzciński, M.J. Bonten, J.W. Rossen, E.A. Sanders, D. Bogaert // ISME J. – 2016. – Vol. 10, No. 1. – P. 97-108.

115. De Young, M.P. Bioinformatics-based discovery of a novel factor with apparent specificity to colon cancer / M.P. De Young, H. Damania, D. Scheurle, C. Zylberberg, R. Narayanan // *In Vivo*. - 2002. – Vol. 16, No. 4. - P. 239—248.

116. Deprez, S. Optimisation of collection, storage and preparation of rat plasma for H-1 NMR spectroscopic analysis in toxicology studies to determine inherent variation in biochemical profiles / S. Deprez, B.C. Sweatman, S.C. Connor, J.N. Haselden, C.J. Waterfield // *J Pharm Biomed Anal*. - 2002. – Vol. 30. - P. 1297— 1310.

117. Dowling, C. Preoperative proton MR spectroscopic imaging of brain tumors: correlation with histopathologic analysis of resection specimens / C. Dowling, A.W. Bollen, S.M. Noworolski // *AJNR. Am. J. Neuroradiol*. – 2001. – Vol. 22, No. 4. – P. 604–612.

118. DuPont, A.W. The intestinal microbiota and chronic disorders of the gut / A.W. DuPont, H.L. DuPont // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*. – 2011. – Vol. 8, No. 9. – P. 523–531.

119. El-Azami-El-Idrissi, M. Pediatric recurrent respiratory tract infections: when and how to explore the immune system? / M. El-Azami-El-Idrissi L.I. Mounia, S. Chaouki, S. Atmani, A. Bouharrou, M. Hida // *The Pan African Medical Journal*. – 2016. - Vol. 24. – P. 53.

120. Fiehn, O. Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes / O. Fiehn // *Plant Mol Biol*. - 2002. – Vol. 48. – P.155—171.

121. Freymuth, F. Detection of respiratory syncytial virus, parainfluenzavirus 3, adenovirus and rhinovirus sequences in respiratory tract of infants by polymerase chain reaction and hybridization / F. Freymuth, A. Vabret, F. Galateau-Salle // *Clin. Diagn. Virol*. – 1997. – Vol 8. – P. 31-40.

122. Freymuth, F. Viruses responsible for respiratory infections in pediatrics. Evaluation of 3,480 nasal aspirates performed in children over a 6-year period / F. Freymuth, M. Quibriac, J. Petitjean // *Ann Pediatr (Paris)*. – 1987. –

Vol. 34. - P. 493-501.

123. Gribbestad, I.S. Metabolite composition in breast tumors examined by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy / Gribbestad I.S., Sitter B., Lundgren S. // *Anticancer Res.* – 1999. – Vol. 19, No. 3A. – P. 1737–1746.

124. Goeminne, P.C. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum headspace through volatile organic compound analysis / P.C. Goeminne, T. Vandendriessche, J.V. Eldere, M.N. Bart, M.L. Hertog, L.J. Dupont // *BioMed. Central.* - 2012. - Vol. 13. - P. 83-87.

125. Gromskia, P.S. A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis – a marriage of convenience or a shotgun wedding / S.P. Gromskia, H. Muhamadalia, D.I. Ellisa // *Analytica Chimica Acta.* – 2015. – Vol. 879. – P. 10-23.

126. Hampson, A. W. The influenza viruses / A.W. Hampson, J.S. Mackenzie // *MJA.* – 2006. – Vol. 185, No 10. – P. 39-43.

127. Henningson, A. Short-chain fatty acid formation at fermentation of indigestible carbohydrates / A. Henningson, I. Bjiirck, M. Nyman // *Scandinavian Journal of Nutritio.* - 2001. - Vol. 45. - P. 165-168.

128. Izumo, T. Effect of intranasal administration of *Lactobacillus pentosus* S-PT84 on influenza virus infection in mice / T. Izumo, T. Maekawa, M. Ida // *International Immunopharmacology.* – 2010. - Vol. 10. - P. 1101–1106.

129. Janak, A. Nasopharyngeal acute phase cytokines in viral upper respiratory infection. / A. Janak, S. Patel, N. K. Revai // *The Pediatric Infection Disease Journal.* – 2009. –Vol. 11. – P. 1002-1007.

130. Janeway, Jr C.A. Innate immune recognition / Jr C.A. Janeway, R. Medzhitov // *Annu Rev. Immunol.* – 2002. –Vol. 20. - P. 197-216.

131. Jartti, T. Identification of respiratory viruses in asymptomatic subjects / T. Jartti // *The Pediatric Infection Disease Journal.* - 2008. - Vol. 12. - P. 1103–1107.

132. Jeffrey, F.M. ¹³C isotopomer analysis of glutamate by tandem mass spectrometry / F.M. Jeffrey, J.S. Roach, C.J. Storey, A.D. Sherry, C.R. Malloy // *Anal Biochem.* – 2002. – Vol. 300, No. 2. – P. 192—205.

133. Jesenak, M. Recurrent Respiratory Infections in Children – Definition, Diagnostic Approach, Treatment and Prevention Bronchitis / M. Jesenak, M. Ciljakova, Z. Rennerova, E. Babusikova, P. Banovcin- Rieka // *University Campus STePri*, 2011. – 190 p.

134. Jesenak, M. Role of biofilm in children with recurrent upper respiratory tract infections / M. Jesenak, M. Ciljakova, Z. Rennerova, E. Babusikova, P. Banovcin // *European Journal of Clinical Microbiology*. - 2014. - Vol. 34. - P. 38.
135. Junyi, Y. Influence of dietary fibers and whole grains on fecal microbiota during in vitro fermentation: Dissertations & Theses in Food Science and Technology / Y. Junyi // *Nebraska-Lincol.*, 2012. - 24 p.
136. Kaddurah-Daouk, R. Metabolomics: a global biochemical approach to the study of central nervous system diseases / R. Kaddurah-Daouk, K.R.R. Krishnan // *Neuropsychopharmacology*. – 2009. – Vol. 34, No. 1. – P. 173–186.
137. Kaddurah-Daouk, R. Metabolomic changes in autopsy-confirmed Alzheimer's disease / R. Kaddurah-Daouk, S. Rozen, W. Matson // *Alzheimers Dement.* – 2011. – Vol. 7, No. 3. – P. 309–317.
138. Kamada, N. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota / N. Kamada, G.Y. Chen, N. Inohara, G. Nunez // *Nat Immunol.* - 2013. - Vol. 14. - P. 685–690.
139. Kamdar, K. Toll-like receptor signaling and regulation of intestinal immunity / K. Kamdar, V. Nguyen, R.W. DePaolo // *Virulence*. - 2013. - Vol. 4. – P. 207-212.
140. Kawase, M. Heat-killed *Lactobacillus gasseri* TM0356 protects mice against influenza virus infection by stimulation gut and respiratory immune response / M. Kawase, F. He, A. Kubota, K. Yoda, K. Miyazawa, M. Hiramatsu // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* - 2012. - Vol. 64. - P. 280–288.
141. Kesson, A.M. Respiratory virus infections / A.M. Kesson // *Pediatric respiratory reviews*. - 2007. – Vol. 8. - P. 240-248.
142. Kowalski, M.L. Nasal secretions in response to acetylsalicylic acid / M.L. Kowalski, M. Sliwinska-Kowalska, Y. Igarashi // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 1993. - Vol. 91, No. 2. - P. 580-598.
143. Lewis, G.D. Application of metabolomics to cardiovascular biomarker and pathway discovery / G.D. Lewis, A. Asnani, R.E. Gerszten // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2008. – Vol. 52, No. 2. – P. 117–123.
144. Lewis, G.D. Metabolite profiling of blood from individuals undergoing planned myocardial infarction reveals early markers of myocardial injury / R. Wei, E. Liu // *J. Clin. Invest.* – 2008. – Vol. 118, No. 10. – P. 3503–3512.

145. Li, R.J. Network of Interactions Between Gut Microbiome, Host Biomarkers, and Urine Metabolome in Carotid Atherosclerosis / R.J. Li, Z.Y. Jie, Q. Feng, R.L. Fang, F. Li, Y. Gao, H.H. Xia, H.Z. Zhong, B. Tong, L. Madsen, J.H. Zhang, C.L. Liu, Z.G. Xu, J. Wang, H.M. Yang, X. Xu, Y. Hou, S. Brix, K. Kristiansen, X.L. Yu, H.J. Jia, K.L. He // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2021. – Vol. 7, No. 11. – P. 708088.
146. Lozupone, C.A. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota / C.A. Lozupone, J.I. Stombaugh, J.I. Gordon, J.K. Jansson, R. Knight // *Nature.* – 2012. - Vol. 489. - P. 220–230.
147. Macfarlane, G.T. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics / G.T. Macfarlane, H. Steed, S. Macfarlane // *Journal of Applied Microbiology.* - 2008. - Vol. 104. - P. 305–344.
148. Mahalanobis, P.C. On the generalised distance in statistics. / P.C. Mahalanobis // *Proceedings of the National Institute of Sciences of India* 2. - 1936. - Vol. 1. - P. 49–55.
149. Mansilla, E. A narrative summary of selected presentations given at the second Encuentro Latinoamericano de Infecciones Respiratorias Recurrentes (ELAIR), an educational summit held in Buenos Aires, Argentina, 4th–5th July 2015 / E. Mansilla, A. Ciceran, J.A. Ortega-Martell // *EMJ Respir.* - 2016. – Vol. 4. - P. 10-17.
150. Mariat, D. The Firmicutes / Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age / D. Mariat, O. Firmesse, F. Levenez, V. Guimarães, H. Sokol, J. Doré, G. Corthier, J.P. Furet // *BMC Microbiol.* - 2009. – Vol. 9. - P. 1-6.
151. Meneghetti, A. Upper Respiratory Tract Infection / A. Meneghetti. – URL: <https://medscape.com>.
152. Michaelis, M. Novel swine-origin *influenza A virus* in humans: another pandemic knocking at the door / M. Michaelis, H.W. Doerr, J. Cinatl // *Med Microbiol Immunol.* – 2009. - Vol. 198. - P. 175-183.
153. Michaelis, M. Of chickens and men: avian influenza in humans / M. Michaelis, H.W. Doerr, J. Cinatl // *Curr Mol Med.* – 2009. - Vol. 9. - P. 131–151.
154. Midulla, F. Rhinovirus bronchiolitis and recurrent wheezing: 1-year follow-up / F. Midulla // *Eur Respir J.* – 2012. - Vol. 39, No. 2. - P. 396-402.
155. Munger, J. Systems-level metabolic flux profiling identifies fatty acid synthesis as a target for antiviral therapy / B.D. Bennett, A. Parikh, X.J. Feng, J.

McArdle, H.A. Rabitz, T. Shenk, J.D. Rabinowitz // *Nat Biotechnol.* – 2008. – Vol. 26, No. 10. – P. 1179-1186.

156. Neish, A.S. *Microbes in gastrointestinal health and disease* / A.S. Neish // *Gastroenterology.* – 2009. – Vol. 136, No. 1. - P 65-80.

157. Nicholson, J.K. ‘Metabonomics’: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data / J.K. Nicholson, J.C. Lindon, E. Holmes // *Xenobiotica.* – 1999. – Vol. 29, No. 11. – P. 1181–1189.

158. Nishiumi, S. A novel serum metabolomics- based diagnostic approach for colorectal cancer / S. Nishiumi, T. Kobayashi, A. Ikeda // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, No. 7. – e40459.

159. Nowicki, J. *Bronchitis and Pneumonia* / J. Nowicki, M.T. Murray // *Textbook of Natural Medicine.* – 2020. – P. 1196–1201.

160. Osipov, G.A. Study of human microecology by mass spectrometry of microbial markers / G.A. Osipov, N.V. Verkhovtseva // *Benef. Microbes.* – 2011. – Vol. 2, No. 1. – P. 63–78.

161. Parada, V.D. Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases / D Parada Venegas, M.K. De la Fuente, G. Landskron, M.J. González, R. Quera, G. Dijkstra, H.M. Harmsen, K.N. Faber, M.A. Hermoso // *Front Immunol.* – 2019. – Vol.11, No. 10. - P. 277.

162. Pasquali, C. Enhanced Mucosal Antibody Production and Protection against Respiratory Infections Following an Orally Administered Bacterial Extract / C. Pasquali, O. Salami, M. Taneja, E.S. Gollwitzer, A. Trompette, C. Pattaroni, K. Yadava, J. Bauer, B.J. Marsland // *Front Med.* - 2014. - Vol.1. - P.41.

163. Pauling, L. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography / L. Pauling, A.B. Robinson, R. Teranishi, P. Cary // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1971. – Vol. 68, No. 10. – P. 2374–2376.

164. Pears, M.R. High resolution ¹HNMR-based metabolomics indicates a neurotransmitter cycling deficit in cerebral tissue from a mouse model of Batten disease / M.R. Pears, J.D. Cooper, H.M. Mitchison // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280, No. 52. – P. 42508–42514.

165. Raja, G. *Recent Advances of Microbiome-Associated Metabolomics Profiling in Liver Disease: Principles, Mechanisms, and Applications* / G. Raja, H. Gupta, Y.A. Gebru, G.S. Youn, Y.R. Choi, H.S. Kim, S.J. Yoon, D.J. Kim, T.J.

Kim, K.T. Suk // International journal of molecular sciences. – 2021. – Vol. 22, No. 3. – P. 1160.

166. Ruuskanen, O. Viral pneumonia / O. Ruuskanen, E. Lahti, L.C. Jennings, D.R. Murdoch // Lancet. – 2011. – Vol. 377, No. 9773. – P. 1264-1275.

167. Shinde, V. Triple-reassortant swine *influenza A (H1)* in humans in the United States, 2005–2009 / V. Shinde, C.B. Bridges, T.M. Uyeki, B. Shu // N Engl J Med. – 2009. - Vol. 360, No. 25. - P. 2616-2625.

168. Spratlin, J.L., Clinical applications of metabolomics in oncology: a review / J.L. Spratlin, N.J. Serkova, S.G. Eckhardt // Clin. Cancer Res. – 2009. – Vol. 15, No. 2. – P. 431–440.

169. Sreekumar, A. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression / A. Sreekumar, L.M. Poisson, T.M. Rajendiran, A.P. Khan, Q. Cao, J. Yu, B. Laxman, R. Mehra, R.J. Lonigro, Y. Li, M.K. Nyati, A. Ahsan, S. Kalyana-Sundaram, B. Han, X. Cao, J. Byun, G.S. Omenn, D. Ghosh, S. Pennathur, D.C. Alexander, A. Berger, J.R. Shuster, J.T. Wei, S.Varambally, C. Beecher, A.M. Chinnaiyan // Nature. - 2009. - Vol. 457. - P. 910-914.

170. Vouk, K. Discovery of phosphatidylcholines and sphingomyelins as biomarkers for ovarian endometriosis / K. Vouk, N. Hevir, M. Ribić-Pucelj // Hum. Reprod. – 2012. – Vol. 27, No. 10. – P. 2955–2965.

171. Watkins, S.M., Lipid metabolome wide effects of the PPARgamma agonist rosiglitazone / S.M. Watkins, P.R. Reifsnnyder, H.J. Pan, J.B. German, E.H. Leiter // Lipid Res. - 2002. – Vol. 43. - P. 1809—1817.

172. WHO (World Health Organization : Cough and cold remedies for the treatment of acute respiratory infections in young children. – URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/66856>.

173. Wu, B.G. The Lung Microbiome and Its Role in Pneumonia / B.G. Wu, L.N. Segal // Clin Chest Med. – 2018. – Vol. 39, No. 4. – P. 677-689.

174. Xian, P The oral microbiome bank of China / P. Xian, Z. Xuedong, X. Xin, L. Yuqing, L. Yan, L. Jiyao, S. Xiaoquan, H. Shi, X. Jian, L. Ga // Int J Oral Sci. - 2018. – Vol. 10, No. 2. – P. 16.

175. Xue, R. Investigation of volatile biomarkers in liver cancer blood using solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry / R. Xue, L. Dong, S. Zhang, C. Deng, T. Liu, J. Wang, X. Shen // Rapid Commun. Mass Spectrom. - 2008. - Vol. 22. - P. 1181-1186.

176. Yang, J. Potential metabolite markers of schizophrenia / J. Yang, T. Chen, L. Sun // *Mol. Psychiatry*. – 2013. – Vol. 18, No. 1. – P. 67–78.
177. Yaqoob Al-Hamdani, F. Evaluation of the Predisposing Factors for Recurrent Respiratory Tract Infections in Iraqi Pediatric Patients / F. Yaqoob Al-Hamdani, B. Zuheir Al-Mutawalli // *AJPS*. - 2014. - Vol. 14, No. 2. - P.89-93.
178. Zaura, E, Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities / E. Zaura, B.J. Keijser, S.M. Huse, W. Crielaard // *BMC Microbiol.* – 2009. – Vol. 9. – P. 259.