

На правах рукописи

Малыгина Ольга Геннадьевна

**ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ МИКРОБИОТЫ
НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ВЫХАЖИВАНИИ В
СТАЦИОНАРЕ**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Архангельск – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Северный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
профессор

Бажукова Татьяна Александровна

Официальные оппоненты:

Боронина Любовь Григорьевна - доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра клинической лабораторной диагностики и бактериологии, профессор кафедры

Червинец Вячеслав Михайлович - доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии, заведующий кафедрой

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2019 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте 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 по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан «_____» _____ 2019 года

Ученый секретарь

диссертационного совета,
доктор медицинских наук, доцент

Борисова Ольга Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Макроорганизм и его микрофлора представляют собой единую, открытую, способную к саморегуляции систему (Лабинская А.С., 2013). Микробиота человека включает более 10000 видов микроорганизмов, которые формируют микробиоценозы - кишечный, урогенитальный, респираторный (Бондаренко В.М. и др., 2007; Суворов А.Н. и др., 2013; Макарова С.Г. и др., 2015).

Микроэкосистемы организма человека формируются после рождения в процессе роста и развития ребенка. Образование устойчивого биоценоза проходит в несколько этапов, что обусловлено становлением иммунной и ферментативной систем, изменением гормонального фона (Бухарин О.В., 2006; Лабинская А.С., 2013; Суворов А.Н. и др., 2013; Бокова Т.А. 2016).

Нормальная микробиота выполняет множество жизненно важных функций и необходима для полноценной жизнедеятельности организма (Шендеров Б.А., 1998; Корниенко Е.А., 2016; Аминова А.И. и др., 2017; Чаплин А.В. и др., 2017). Нарушение состояния микрофлоры приводит к существенным метаболическим и иммунологическим сдвигам в организме-хозяине, что впоследствии способствует развитию хронических заболеваний сердечно-сосудистой, эндокринной системы и косвенно связаны с психическими и аутоиммунными процессами (Бельмер С.В., 2010; Егшатын Л.В. и др., 2015).

Формирование микроэкологической системы новорожденного - сложный и индивидуальный процесс, зависящий от многих факторов: состава микробиоценозов матери, способа родоразрешения, характера вскармливания, антимикробной терапии и различных воздействий окружающей среды (Кафарская Л.И. и др., 2006; Буланов Р.Л., 2008; Николаева И.В., 2009, 2011; Макарова С.Г. и др., 2015; Underwood M. A. et al., 2015; Collado M.C. et al., 2015; Arboleya S. et al., 2017).

С введением приказа МЗ РФ от 27 декабря 2011 года N 1687н «О медицинских критериях рождения, форме документа о рождении и порядке его выдачи» основными медицинскими критериями рождения являются – срок беременности 22 недели и более и масса тела ребенка при рождении 500 грамм и более. Согласно данному документу стало приоритетным направлением выхаживание недоношенных детей, особенно с очень низкой (менее 1500 г) и экстремально низкой (менее 1000 г) массой тела при рождении (Сурков Д.Н. и др., 2012).

Глубоконедоношенные дети ввиду морфофункциональной незрелости органов и систем особенно подвержены влиянию факторов внешней среды. Недостаточность микробного разнообразия предрасполагает к нарушению физиологических процессов резидентной микрофлоры в процессе колонизации, приобретению устойчивых к антибиотикам штаммов микроорганизмов и к развитию воспалительных заболеваний, обусловленных факультативной и транзитной микрофлорой (Кафарская Л.И. и др., 2006; Любасовская Л.А., 2013; Суворов Е.И. и др., 2013; Ло Скиаво Л.А. и др., 2014; Arboleya S. et al., 2016).

Следовательно, изучение формирования микробиоты основных биоценозов (кишечный, урогенитальный и респираторный) у недоношенных детей с очень низкой и экстремально низкой массой тела при динамическом наблюдении и выявление основных факторов, влияющих на становление микроэкологии организма недоношенного ребенка, необходимо для раннего выявления и предупреждения перехода микробиологических нарушений в хронические и затяжные формы заболеваний.

Степень разработанности темы исследования

С внедрением молекулярно-генетических технологий активно стала изучаться микробиота человека (Human Microbiome Project и Российский Метагеномный проект). В 2012 г. опубликовано полное описание состава и разнообразия микробиомов пяти локализаций человеческого организма (кишечник, кожа, носовая полость, полость рта, влагалище). Изучение микробиома проводилось преимущественно у взрослого населения. Показано, что общий геном бактерий, обнаруженных в желудочно-кишечном тракте в 12 раз превышает геном человека.

Представления о формировании микробиоты новорожденных детей были получены в основном при обследовании доношенных новорожденных, при этом большая часть исследований посвящена изучению формирования микрофлоры толстой кишки. Подробно описана динамика формирования микроэкологии доношенных новорожденных в зависимости от микробного статуса матери (Савченко Т.Н., 2011) с проведением молекулярного и микробиологического мониторинга становления микрофлоры кишечника (Донских Е.Е., 2010), в зависимости от вида родоразрешения (Лебедева О.В., 2000; Буланов Р.Л., 2008). Приводятся сведения о характере микрофлоры кишечника в динамике и путях её коррекции (Кафарская Л.И. и др., 2006, 2011). Изучение микрофлоры респираторного (Петрашева, Е.Е. 2010; Касумова А.М., 2015) и урогенитального тракта (Панова Л.Д., 2010; Чугунова О.Л., 2010) новорожденных детей проводилось при развитии инфекционно-воспалительных процессов. Среди работ по изучению микрофлоры у недоношенных детей внимание исследователей уделено микробному биоценозу кишечника при различных видах вскармливания (Антипова И.П., 2005), клинико-иммунологическим особенностям (Чарипова Б.Т., 2013) и роли госпитальных штаммов условно-патогенных микроорганизмов в развитии гнойно-септических инфекций (Мухамедзян М.Н., 2010; Любасовская Л.А., 2013).

Наряду с проведенными исследованиями вопросы формирования микробиоты (кишечного, урогенитального и респираторного тракта) организма ребенка с очень низкой и экстремально низкой массой тела на протяжении первого года жизни остаются неизученными.

Цель исследования – провести анализ формирования микробиоты основных биотопов у недоношенных детей с очень низкой и экстремально низкой массой тела при динамическом наблюдении и выявить основные факторы, влияющие на процесс становления микрофлоры организма ребенка.

Задачи исследования:

1. Изучить характер микробиоты верхних дыхательных путей (отделяемое зева), мочевой системы, толстой кишки недоношенных детей с очень низкой и экстремально низкой массой тела.
2. Установить динамику становления микробного состава кишечного, урогенитального и респираторного биоценозов у недоношенных детей.
3. Определить факторы, влияющие на формирование микробиоты основных биотопов у данной группы детей.
4. Оценить влияние длительной антибиотикотерапии на формирование облигатной микрофлоры и носительства патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.
5. Разработать алгоритмы микробиологического мониторинга и наблюдения за недоношенными детьми, с целью раннего выявления возможной патологии, связанной с воздействием условно-патогенных микроорганизмов.

Научная новизна исследования

На основе микробиологического обследования установлено, что для недоношенных детей с очень низкой и экстремально низкой массой тела на этапе выхаживания в стационаре характерны выраженные нарушения микроэкологии желудочно-кишечного и респираторного тракта, представленные дефицитом *Lactobacillus spp.* (91,4%), *E.coli* с сохраненными свойствами (94,8%), *Bifidobacterium spp.* (51,7%) и *Enterococcus spp.* (44,8%) в толстой кишке; зеленающих стрептококков (91,4%) и отсутствие *Lactobacillus spp.* в отделяемом зева, на фоне роста контаминации условно-патогенными представителями во всех изучаемых биотопах.

Динамика наблюдения показала, что у недоношенных детей к 12 месяцам их жизни микробиота основных биотопов является несформированной: в толстой кишке сохраняется дефицит лактофлоры, особенно у детей с массой тела менее 1000 грамм; в отделяемом зева - зеленающих стрептококков, при увеличении дрожжеподобных грибов *Candida (C.tropicalis)*; прослеживается общая негативная тенденция к сохранению высокой частоты представителей семейства *Enterobacteriaceae*.

При проведении корреляционного и факторного анализа получены новые данные о мультифакторном воздействии на процесс становления микробиоты (реанимационные мероприятия, длительность выхаживания в стационаре и антибактериальная терапия), что в последующем может привести к развитию патологии, требующей персонализированного подхода ведения и наблюдения за недоношенными детьми.

Использование факторного анализа позволило установить особенности формирования микробиоты основных биотопов на фоне антимикробной терапии при длительном выхаживании детей в условиях неонатального стационара и контаминации изучаемой группы детей антибиотикорезистентными штаммами коагулазотрицательных стафилококков и неферментирующих грамотрицательных бактерий, что может стать причиной длительного течения гнойно-воспалительных заболеваний.

Теоретическая и практическая значимость работы

Совокупность полученных данных исследования доказывает положения, вносящие вклад в расширение представлений о микробиоценозах толстой кишки, ротоглотки и мочевой системы недоношенных детей с очень низкой и экстремально низкой массой тела на протяжении первого года жизни.

Доказано, что массивная антибиотикотерапия способствует задержке формирования облигатной микрофлоры основных биотопов (толстая кишка, зев, мочевыделительная система) у недоношенных детей при длительной госпитализации в стационаре.

Изучены корреляционные взаимосвязи между представителями микробиоты толстой кишки и смежных биотопов, установлены основные факторы, влияющие на контаминацию основных биотопов условно-патогенными микроорганизмами, что позволяет разработать модели противоэпидемических мероприятий в неонатальном стационаре, направленных на разобщение недоношенных младенцев, находившихся на лечении в реанимационном отделении и не пребывающих в нем.

Модернизированный бактериологический метод диагностики микробиоты толстой кишки с введением исследования цельного материала для выявления энтеробактерий (*E.coli*) и первого разведения фекалий для обнаружения бифидобактерий, лактобактерий, энтерококков, энтеробактерий, гемолитических форм микроорганизмов у недоношенных детей в неонатальном периоде позволяет обнаружить микробиологические изменения облигатной микрофлоры для осуществления персонализированной биокоррекции нарушений нормофлоры.

Результаты проведенной работы позволили обосновать необходимость микробиологического мониторинга за микробиотой основных биотопов у недоношенных детей с очень низкой и экстремально низкой массой тела на этапе выхаживания в стационаре и на протяжении первого года жизни ребенка. На основании проведенного динамического мониторинга микробиоты разработаны алгоритмы обследования и наблюдения за недоношенными детьми на протяжении первого года жизни «Микробиологический мониторинг микробиоты недоношенных детей с очень низкой и экстремально низкой массой тела», которые внедрены в работу перинатального центра города Архангельска (утверждены ЦКМС ФГБОУ ВО СГМУ (г.Архангельск) Минздрава России, протокол №2 от 25.10.2018 года, акт внедрения 6.11.2018 года).

Полученные данные антибиотикорезистентности условно-патогенных микроорганизмов в городе Архангельске в составе микробиоценозов необходимы для разработки протоколов антимикробной терапии в неонатальных отделениях перинатального центра. Постоянный контроль за появлением и циркуляцией антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов требует создания локального формуляра использования антибиотиков и формирования оптимального плана закупок антимикробных препаратов.

Материалы диссертации используются в педагогическом процессе в лекционном материале и на практических занятиях по микробиологической диагностике микробиоты для врачей – бактериологов и студентов педиатрического факультета, факультета медико-профилактического дела и медицинской биохимии, проводимых на кафедре клинической биохимии, микробиологии и лабораторной диагностики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (акт внедрения от 1.03.2017 года).

Методология и методы исследования

Методология научной работы спланирована в соответствии с поставленными задачами исследования. Теоретической основой исследования являются данные научной литературы (статьи, монографии, авторефераты), посвященные микрофлоре новорожденных детей, как доношенных, так и недоношенных младенцев и влияние факторов на ее формирование. Планирование и проведение исследований осуществлялось на основе общенаучных и специфических методов: микробиологических, молекулярно-генетических и методов статистической обработки результатов. Объектом исследования явились облигатные, условно-патогенные бактерии, грибы, выделенные из биологических материалов.

Для решения поставленных задач было проведено обследование 58 недоношенных детей с очень низкой (48 детей, 82,8%) и экстремально низкой массой тела (10 детей, 17,2%) при рождении. Наблюдение за формированием микробиоты происходило в динамике - при поступлении детей в отделение патологии новорожденных и недоношенных детей Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Архангельской области «Архангельская детская клиническая больница имени П.Г. Выжлецова», при выписке из стационара, в возрасте 6 и 12 месяцев. Микробиологические и молекулярно-генетические исследования проводили в лаборатории кафедры клинической биохимии, микробиологии и лабораторной диагностики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Исследовали

микрофлору зева, толстой кишки и мочу. Сбор биологического материала для бактериологического метода осуществлялся в соответствии с методическими указаниями МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории». В бактериологическое исследование включено 696 клинических образцов, в результате которых выделено 2088 штаммов микроорганизмов. При выявлении условно-патогенных микроорганизмов в количестве $\geq 10^4$ КОЕ/г/мл изучена чувствительность к антибактериальным препаратам у 241 штамма микроорганизмов.

Для молекулярно-генетического исследования проводили забор венозной крови (плазма), отделяемого верхних дыхательных путей, мочи. В результате исследования выделено 32 ДНК микроорганизмов (*Cytomegalovirus*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*).

Микробиологические методы исследования

Микробиологические исследования биологического материала проводили согласно приказа Министерства здравоохранения СССР № 535 от 22 апреля 1985г «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений». Контроль качества питательных сред проводили согласно методических указаний МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред». Отделяемое зева засеивали на 5% кровяной агар на основе ГРМ-агара (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), маннит-солевой агар (Conda «Pronadisa», Испания), шоколадный агар (основа колумбийского агара), Сабуро декстрозный агар (Conda «Pronadisa», Испания), среда Эндо-ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), тиогликолевую среду (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) по методу Gould и инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 24 - 48 часов. Посевы с 5% кровяным и шоколадным агаром инкубировали в CO₂ -инкубаторе (5% CO₂). Посев мочи проводили методом секторных посевов на чашки Петри с плотной питательной средой – 5% кровяной агар, среду Эндо-ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), HiCromeUTI агар (Hiimedia, Индия). Чашки инкубировали при 37°C 18-24 часа. Определение степени бактериурии оценивали по количеству выделенных колоний ($\geq 10^4$ КОЕ/мл). Для изучения микрофлоры толстой кишки исследовали фекалии. Из исследуемого материала готовились серийные разведения в физиологическом растворе и высевались на питательные среды: 5% кровяной агар, агар Эндо (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), маннит-солевой агар (Conda «Pronadisa», Испания), Сабуро декстрозный агар (Conda «Pronadisa», Испания), Шадлера агар (Conda «Pronadisa», Испания), MRS агар (Conda «Pronadisa», Испания), железосодержащий сульфитный агар (Hiimedia, Индия), бифидум – среда (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), энтерококкагар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), агар с фенилаланином (Conda «Pronadisa», Испания). В связи с отсутствием посева микрофлоры в разведениях 10³, нами были добавлены для посева 10¹ и цельный материал. Посевы инкубировали при температуре 37°C в течение 48 - 72 часов. Чашки Петри с MRS средой инкубировали при атмосфере 5% CO₂ в течение 48 часов. Оценку результатов проводили в соответствии с отраслевым стандартом 91500.110004-2003. «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника». Приказ МЗ РФ №231 от 9.06.2003 г.

Идентификацию микроорганизмов проводили по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам, используя руководства и справочники по микробиологической технике (Определитель бактерий Берджи, 1997; Клиническая микробиология под ред. Меншикова В.В., 2009; Manual of Clinical Microbiology Murray P.R., 2007).

Молекулярно-генетический метод (ПЦР-диагностика) исследования

Выделение ДНК из клинического материала проводили с использованием комплекта реагентов («Проба-ГС» ООО «НПО ДНК – Технология», Россия). Выявление и дифференциацию специфических фрагментов генома *S.albicans* (Канд-ген), *Cytomegalovirus* (ЦМВ-ген), *S.trachomatis* (Хлами-ген), *EBV*, *HSV 1,2* типов (ВПГ-ген), *HHV6*, *HHV8*, *M.hominis* (Плазмоген-Мх), *U.urealyticum* (Плазмоген-УП) в клиническом материале осуществляли методом ПЦР (формат “Real-time”) с использованием набора реагентов (ООО «НПО ДНК – Технология», Россия). Амплификацию и интерпретацию результатов осуществляли с помощью прибора ДТ-322 (ООО «НПО ДНК – Технология», Россия).

Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам

Исследование проводилось согласно критериям EUCAST (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/), Клиническим рекомендациям Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» версия 2015-02 и МУК «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» 4.2.1890-04. Определение чувствительности к антибактериальным препаратам выполняли на агаре Мюллера-Хинтона (Conda «Pronadisa», Испания) диско-диффузионным методом с использованием дисков с антибиотиками («Bio-Rad», Франция; «Himedia», Индия).

Методы статистической обработки данных

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программы SPSS (v.18.0). Для признаков, имеющих распределение, отличное от нормального, данные представлены в виде медианы (Me) и процентилей (P 25;75). Для сравнения количественных данных в двух связанных выборках использовался непараметрический критерий Вилкоксона, в двух независимых группах - критерий Манна-Уитни. При сравнении качественных данных в двух связанных выборках применялся критерий Мак-Нимара, в двух несвязанных выборках – точный критерий Фишера, χ -квадрат Пирсона. Для определения характера взаимоотношений между изучаемыми переменными проведены корреляционный (коэффициент корреляции Спирмена) и факторный анализы. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Личное участие автора в получении результатов

Личный вклад автора заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования: от разработки дизайна научного исследования, проведения обзора литературы по теме работы, выполнения всего объема бактериологических, молекулярно-генетических исследований, статистического анализа полученных данных. Подбор пациентов проводился совместно с сотрудниками кафедры неонатологии и перинатологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации – д.м.н., профессором Чумаковой Г.Н., Лобановой Е.В. Микробиологические и молекулярно-генетические исследования выполнены совместно с сотрудниками кафедры клинической биохимии, микробиологии и лабораторной диагностики – к.б.н., доцентом Лисишниковой Л.П., к.б.н., доцентом Симоновой Г.В. Автор провел систематизацию полученных результатов, сформулировал выводы, практические рекомендации и перспективы дальнейшего исследования.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. В неонатальном периоде у недоношенных детей с массой тела менее 1500 г микробиота верхних дыхательных путей, мочевыделительной системы и толстой кишки характеризуется выраженным дефицитом облигатного пула, преимущественно за счет лактобактерий и появлением гемолизинпродуцирующих кишечных палочек, с постоянным изменением видового состава условно-патогенных представителей на фоне длительной госпитализации в стационаре (свыше 50 дней).
2. На становление микробиоты ребенка ведущую роль оказывают госпитализация в реанимационном отделении и массивная антибактериальная терапия, что приводит к контаминации условно-патогенными и патогенными госпитальными антибиотикорезистентными представителями и требует длительного микробиологического мониторинга за данной группой детей.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность полученных результатов основана на достаточном объеме материала и современных методиках сбора и обработки информации. В работе применяли бактериологические и молекулярно-генетические методы исследований. Изучено 2088 штаммов, выделенных из клинических материалов недоношенных детей с очень низкой и экстремально низкой массой тела; 241 определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Статистический анализ данных осуществляли с помощью компьютерной программы SPSS (v.18.0).

Диссертация апробирована на расширенном заседании кафедр клинической биохимии, микробиологии и лабораторной диагностики; неонатологии и перинатологии; инфекционных болезней Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол №1 от 10 марта 2017 года).

Результаты исследования представлены и обсуждены на III Архангельской международной медицинской научной конференции молодых ученых и студентов (Архангельск, апрель 2010), итоговой научной сессии СГМУ и СНЦ СЗО РАМН «Медицинские школы Европейского Севера: от науки к практике» (Архангельск, ноябрь 2010), IV Архангельской международной медицинской научной конференции молодых ученых и студентов (Архангельск, апрель 2011), на 13-ом Славяно-Балтийском научном форуме «Санкт-Петербург - Гастро-2011» (Санкт-Петербург, май 2011), итоговой научной сессии СГМУ и СНЦ СЗО РАМН «Северная медицинская школа: история и современность» (Архангельск, октябрь 2011), V Архангельской международной медицинской научной конференции молодых ученых и студентов (Архангельск, май 2012), итоговой научной сессии СГМУ и СНЦ СЗО РАМН «Северная медицинская школа: к 80-летию АГМИ-АГМА-СГМУ» (Архангельск, ноябрь 2012), итоговой научной сессии СГМУ и СНЦ СЗО РАМН «Северная хирургическая школа: к 100-летию со дня рождения Н.М. Амосова» (Архангельск, ноябрь 2013), научно-практической конференции «Новые технологии лабораторного анализа и их клиническое применение» в рамках Лабораторных дней в Архангельске (Архангельск, март 2015), итоговой научной сессии Северного государственного медицинского университета «Идеи М.В. Ломоносова и развитие Российской медицины» (Архангельск, ноябрь 2015), итоговой научной сессии Северного государственного медицинского университета «М.В. Ломоносов и традиции Арктической медицины, посвященная 305-летию со дня рождения М.В.Ломоносова» (Архангельск, ноябрь 2016), итоговой научной сессии

Северного государственного медицинского университета «Актуальные вопросы жизнедеятельности человека в Арктике: экологические, медицинские и социальные аспекты» (Архангельск, ноябрь 2017).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, из них 4 статьи в рецензируемых изданиях, 2 тезисов в рецензируемых изданиях, 3 – в других изданиях, 5 – в материалах конференций.

Объём и структура диссертации

Диссертация изложена на 170 страницах компьютерного текста, иллюстрирована 9 таблицами, 47 рисунками. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы. Список литературы включает 214 источников, из них 163 работы отечественных авторов и 51 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Формирование микробиоты основных биотопов недоношенных детей с ОНМТ и ЭНМТ в динамике

Организм человека и населяющие его микроорганизмы — это единая экосистема. Нормальная микрофлора сопутствует своему хозяину на протяжении всей его жизни, влияя на процессы развития и жизнедеятельности.

Исследование микробиоты толстой кишки у детей при поступлении в отделение позволило выявить выраженный дефицит облигатных представителей: типичные *E.coli* регистрировали у 5,2% детей в очень низком количестве 1,6 lg КОЕ/г; *Bifidobacterium spp.* определяли у 48,3 % в низкой численности 3,0 lg КОЕ/г; *Lactobacillus spp.* выявляли только у 8,6% (7,1 lg КОЕ/г). Следует заметить, что *Lactobacillus spp.* не обнаруживали у детей с ЭНМТ. К выписке отмечено заселение толстой кишки типичными *E.coli* у 60,3% ($p<0,001$); *Bifidobacterium spp.* практически всех детей (98,3%; $p<0,001$) в количестве 9,0 lg КОЕ/г ($p<0,001$). Частота встречаемости *Lactobacillus spp.* возросла в 3 раза до 29,3% ($p=0,012$). В возрасте 6 месяцев у всех детей определялись *Bifidobacterium spp.* (11,0 lg КОЕ/г; $p<0,001$). Вместе с тем произошло увеличение типичных *E.coli* до 93,1% ($p=0,012$) случаев (8,8 lg КОЕ/г), а *Lactobacillus spp.* до 74,1% ($p<0,001$). К возрасту 12 месяцев среди облигатных представителей не сформирован пул лактофлоры (Рисунок 1).

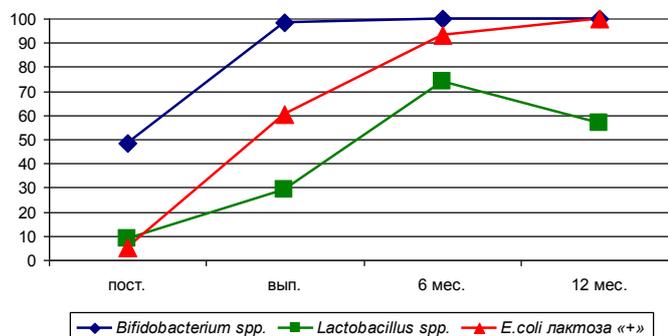


Рисунок 1 – Частота выявления облигатной микрофлоры толстой кишки у недоношенных детей в динамике (%)

Факультативно-анаэробные микроорганизмы энтерококки (с преобладанием *E.faecium*) и КОС (преимущественно *S.epidermidis*) выявляли у половины обследованных детей в неонатальном периоде. В 36,2% случаев высевали грибы рода

Candida в численности 5,6 lg КОЕ/г, которые были представлены тремя видами, с преобладанием *C.tropicalis*. Частота обсеменения толстой кишки условно-патогенными энтеробактериями и НГОБ обнаружена в 19,0% и 17,2% детей, соответственно, в численности превышающей возрастную норму. ГОЭБ представлены шестью родами, среди которых выделяли *K.pneumoniae* (5,2%, 5,7 lg КОЕ/г), *E.aerogenes* (3,4%, 6,7 lg КОЕ/г), *C.koseri* (3,4%, 2,6 lg КОЕ/г), *S.odorifera* (1,7%, 8,4 lg КОЕ/г), *S.liquefaciens* (1,7%, 3,7 lg КОЕ/г), *P.vulgaris* (1,7%, 6,5 lg КОЕ/г), *H.alvei* (1,7%, 6,7 lg КОЕ/г). НГОБ - с преобладанием *P.aeruginosa*. Анаэробные микроорганизмы представлены только *Bacteroides spp.* (3,4%). При выписке из стационара практически в два раза (94,8%; $p<0,001$) отмечен рост энтерококков, с одновременным увеличением их средней численности (10,8 lg КОЕ/г), без изменения видового пейзажа. Произошло статистически значимое снижение КОС до 18,9% ($p=0,002$) за счет *S.haemolyticus* и *S.hominis*. На фоне этого отмечено изменение количественного и качественного состава анаэробных представителей с увеличением частоты регистрации *Bacteroides spp.* в 10 раз (34,5%; $p<0,001$) и появление у 24,1% (4,0 lg КОЕ/г) детей *Clostridium spp.* Наблюдалась тенденция к снижению выделения грибов *Candida* в 7 раз до 5,2% ($p<0,001$), с уменьшением их численности (4,8 lg КОЕ/г). Отмечено усиление интенсивности обсеменения толстой кишки условно-патогенными энтеробактериями (69,0%; $p<0,001$) с одновременным расширением видового спектра до 10. Наиболее значимый рост отмечен в отношении *Klebsiella spp.* ($p=0,007$) за счет *K.pneumoniae* и *Serratia spp.* ($p=0,002$) за счет *S.odorifera*. У 22,4% детей появились лактозонегативные и у 3,4% гемолитические штаммы эшерихий в количестве (8,2 и 7,6 lg КОЕ/г, соответственно). Частота НГОБ снизилась до 3,4 % ($p=0,006$), при высоком количестве (7,7 lg КОЕ/г). В возрасте 6 месяцев у всех детей определялись энтерококки (8,4 lg КОЕ/г; $p=0,001$), частота встречаемости КОС продолжала снижаться до 10,3% и представлена монокультурой (*S.epidermidis*). Кроме того происходило увеличение контаминации *S.aureus* (10,3%; 3,6 lg КОЕ/г). Частота обнаружения лактозонегативных штаммов *E.coli* и энтеробактерий осталась на прежнем уровне (25,9% и 63,8%, соответственно). Анализ видового спектра показал сужение разнообразия микроорганизмов до 7 представителей. НГОБ полностью элиминированы из толстой кишки. Продолжал увеличиваться анаэробный пул микроорганизмов *Bacteroides spp.* (60,3%) и *Clostridium spp.* (13,8%). В возрасте 12 месяцев представители семейства *Enterobacteriaceae* оставались без изменений (67,2%), но происходила постоянная сукцессия видового разнообразия. Схожая картина отмечена и в отношении КОС. Частота регистрации *Bacteroides spp.* увеличилась до 82,7%, а *Clostridium spp.* – 17,2% (Рисунок 2).

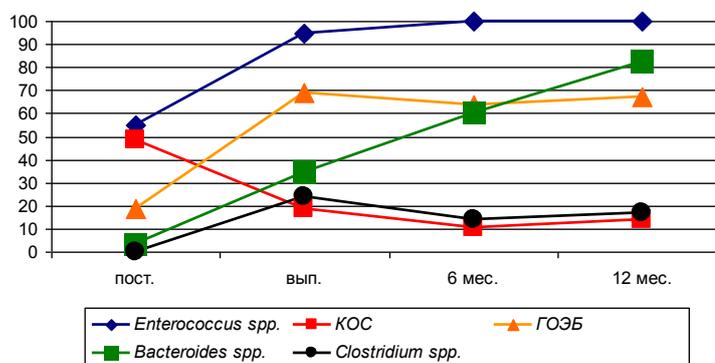


Рисунок 2 – Частота выявления факультативной микрофлоры толстой кишки у недоношенных детей в динамике (%)

Таким образом, для недоношенных детей с массой тела менее 1500 г характерно замедленное формирование облигатного пула микрофлоры толстой кишки и к первому году жизни полной сформированной микробиоты данного биотопа не наблюдается.

Микробный пейзаж ВДП у недоношенных детей в неонатальном периоде был скудным и представлен преимущественно кокковой флорой - КОС, выделены у 74,1% (*S.epidermidis*, *S.haemolyticus*); α -зелеными стрептококками (*S.mutans*, *S.sanguis*, *S.oralis*, *S.mitis*); энтерококками (6,9%), представителями семейства *Neisseriaceae* (*N.lactamica*) и *Corynebacterium* (*C.xerosis*) у 1,7% детей при отсутствии регистрации последних у детей с ЭНМТ. Исходный уровень ГОЭБ был невысоким (5,2%), с узким видовым спектром (*K.pneumoniae*, *E.aerogenes*). Носительство *S.pneumoniae* отмечено у 5,2%, *S.pyogenes* - у 1,7% детей. Грибы рода *Candida* выделяли у 8,6%, с преобладанием *C.tropicalis*. НГОБ (*P.aeruginosa*) регистрировали у 13,8% детей.

За период госпитализации в стационаре происходило постепенное формирование микроэкологии ВДП за счет уменьшения частоты встречаемости КОС в 1,5 раза до 48,3% ($p=0,003$) с одновременным снижением количества и увеличением α -зеленых стрептококков в 4,5 раза до 41,4% ($p=0,001$) с расширением видового спектра до 5 представителей. Отмечено увеличение частоты выявления энтерококков в 3 раза ($p=0,013$) со значительным преобладанием *E.faecium*. Частота встречаемости представителей семейства *Neisseriaceae* увеличилась в 2 раза 3,4 % без изменения их количества. *C.xerosis* остались к выписке на прежнем уровне. Обращает на себя внимание, что к выписке из стационара у половины обследуемых детей из отделяемого зева выделяли ГОЭБ (50,0%; $p=0,001$), представленные *K.pneumoniae*, *E.coli*, *S.liquefaciens*, *S.odorifera*, *C.freundii*, *H.alvei*. Также в 2,5 раза произошло увеличение контаминации слизистой зева грибами *Candida*, особенно у детей с ЭНМТ. Пребывание детей в стационаре приводило к формированию носительства стрептококков группы 'milleri' (5,2%) и *H.influenzae* (1,7%). На фоне этого мы обнаружили снижение удельного веса *P.aeruginosa* до 1,7%, но появление бактерий рода *Moraxella*.

В возрасте 6 месяцев в отделяемом зева доминирующее положение было у грамположительной кокковой флоры, за счет α -зеленых стрептококков (79,3%; $p=0,008$) и КОС (63,8%) с изменением видового состава, за счет сужения спектра ГОЭБ. На фоне этого отмечено, что в домашних условиях у 24,1% детей происходит контаминация ВДП *S.aureus*. Положительная тенденция наблюдалась в отношении снижения контаминации ВДП ГОЭБ (25,9%; $p=0,035$) с одновременным значительным уменьшением численности данных представителей (2,0 lg КОЕ/г) и сужением спектра до 4 видов. Несмотря на положительную динамику, доминирующими представителями остаются госпитальные штаммы (*K.pneumoniae*). Так же произошло снижение в 2 раза частоты и численности обсеменения ВДП грибами *Candida*, с выделением только *C.tropicalis*. У детей в возрасте 6 месяцев не выделяли из ВДП стрептококки группы 'milleri', *H.influenzae* и *S.pneumoniae*, что свидетельствует о транзитном носительстве данных микроорганизмов.

К возрасту 12 месяцев микроэкология ВДП у недоношенных детей не сформирована, это подтверждается тем, что КОС и α -зеленые стрептококки выявляли только у половины детей. У четверти детей выделяли *S.aureus*. Отмечен значительный рост дрожжеподобных грибов *Candida*, за счет *C.tropicalis* (25,9%). У 13,8% детей произошла контаминация ВДП *H.influenzae* и *M.catarrhalis* (10,3%), вследствие низкой иммунной реактивности организма ребенка в данном возрасте. Продолжалась намеченная положительная динамика в снижении выявления ГОЭБ (17,2%) при регистрации только *E.coli* и НГОБ (*P.aeruginosa*) (Рисунок 3).

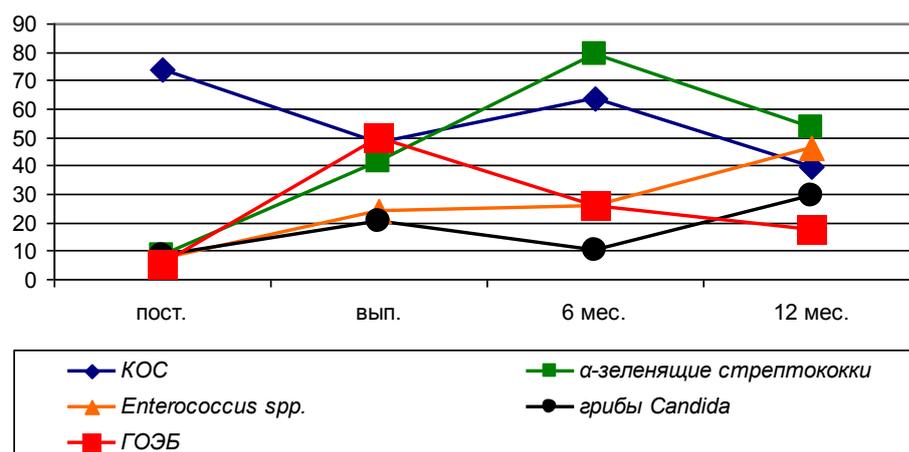


Рисунок 3 - Микробный пейзаж верхних дыхательных путей у недоношенных детей в динамике (%)

Таким образом, доминирующей флорой на слизистой ВДП во всех возрастных периодах является грамположительная кокковая флора. Наряду с кокками при выписке из стационара значительную роль имеют ГОЭБ, с постепенным снижением данных микроорганизмов к возрасту 1 года и дрожжеподобные грибы *Candida*, рост которых к году возрастает.

Доминирующей микрофлорой МВС у недоношенных детей в неонатальном периоде были грамположительные кокки – КОС (13,8%) и энтерококки (10,3%), с преобладанием *S.epidermidis* (8,6%) и *E.faecium* (6,9%). Условно-патогенные энтеробактерии представлены только *E.coli* (3,4%; 3,0 lg КОЕ/мл), а НГОБ *P.aeruginosa* (3,4%; 5,3 lg КОЕ/мл). У 13,8% детей регистрировали грибы рода *Candida*, преобладали *C.tropicalis* (8,6%). За период выхаживания в стационаре отмечен рост в 3 раза (94,8% детей, $p < 0,001$) всей изучаемой бактериальной флоры с одновременным количественным увеличением ($p < 0,001$). Следует отметить резкое увеличение штаммов грамотрицательных энтеробактерий (75,9%, $p < 0,001$) с расширением видового состава до 6 представителей. Наиболее часто выделяли из мочи *E.coli* (34,5%, $p < 0,001$), *K.pneumoniae* (24,1%), *S.odorifera* (10,3%). НГОБ (*P.aeruginosa*) выявляли у 5,2% детей. Положительная динамика отмечена в элиминации из МВС грибов рода *Candida*.

В возрасте 6 месяцев у всех обследованных детей в моче регистрировали микроорганизмы, в среднем количестве 4,0 lg КОЕ/мл. Микрофлора представлена грамположительными кокками (КОС (36,2%, 3,6 lg КОЕ/мл)), энтерококками (53,4%, 4,0 lg КОЕ/мл) и ГОЭБ (79,3%) при увеличении численности данных представителей ($p = 0,030$). Произошла сукцессия видового состава, так чаще других выделяли *E.coli* (63,8%), клебсиеллы, с прежней частотой регистрировали *S.liquefaciens* и появились новые штаммы - *C.koseri* (6,9%) и *P.vulgaris* (10,3%).

К возрасту 1 года у 93,1% детей в моче присутствовали микроорганизмы, за счет КОС (*S.epidermidis* (20,7%), *S.haemolyticus* (10,3%), *S.saprophyticus* (3,4%), *S.hominis* (6,9%)). Энтерококки представлены только одним видом - *E.faecalis* (43,1%). Снижился процент выявления ГОЭБ до 50,0% ($p = 0,049$) с одновременным снижением численности ($p = 0,016$) при сохранении разнообразного видового пейзажа (7 представителей). Среди НГОБ произошла смена *P.aeruginosa* на *Acinetobacter spp.* (3,4%, 4.0 lg КОЕ/мл) (Рисунок 4).

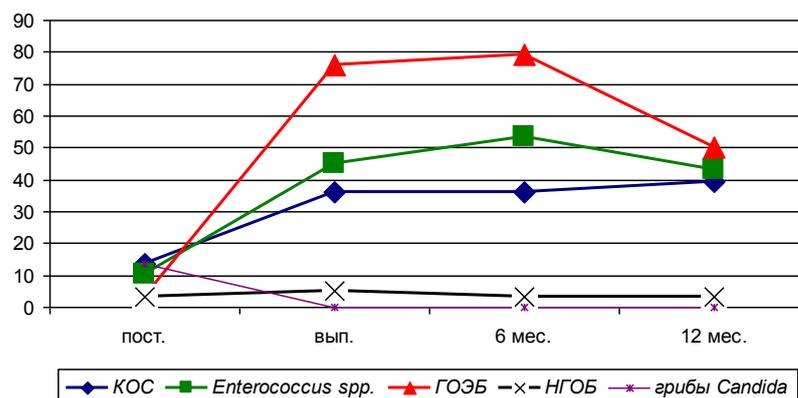


Рисунок 4 - Микробный пейзаж МВС у недоношенных детей в динамике (%)

Таким образом, микробиота мочи представлена кокковой флорой (КОС и *Enterococcus spp.*), уровень которой остается без значительных колебаний с возраста 2 месяцев (средний возраст детей при выписке из стационара). Отмечен значительный рост ГОЭБ за период госпитализации в стационаре с сохранением высокого уровня до возраста 6 месяцев. Значительных колебаний в отношении НГОБ не выявлено. Дрожжеподобные грибы регистрировали только в неонатальном периоде.

Корреляционный анализ микробиоты недоношенных детей

Проведенный корреляционный анализ формирования основных микробиоценозов недоношенных детей при поступлении в отделение выявил, что у детей с малым сроком гестации происходит одномоментная контаминация ВДП ($r_s = -0,38, p=0,003$) и толстой кишки ($r_s = -0,32, p=0,015$) *P.aeruginosa*. Выявлены прямые связи между массой тела при рождении с *C.tropicalis* мочи ($r_s = 0,40, p=0,002$) и *Lactobacillus spp.* толстой кишки ($r_s = 0,26, p=0,045$), что свидетельствует о заселении лактофлорой у детей с массой тела более 1000г (Рисунок 5).

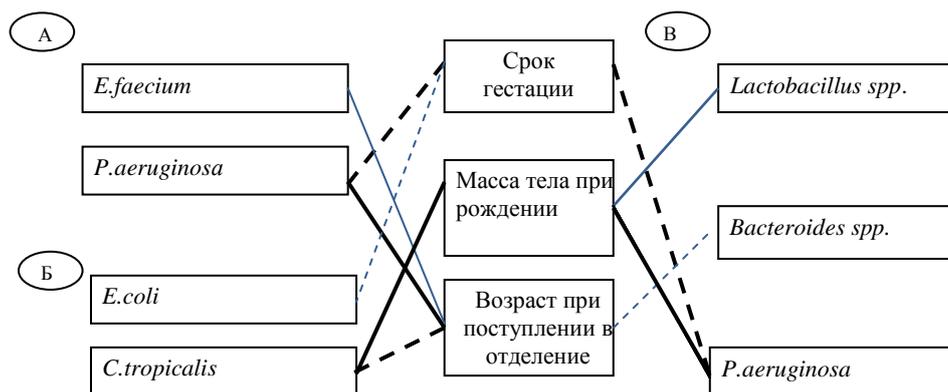


Рисунок 5 - Корреляционный анализ срока родов, массы тела, возраста при поступлении и микробиологических показателей отделяемого зева (А), мочи (Б) и фекалий (В) при поступлении в отделение

Примечания: сплошная линия – прямая корреляционная связь, пунктирная линия – обратная корреляционная связь.

r_s от 0,01 до 0,29 слабая сила _____ r_s от 0,3 до 0,69 средняя сила _____

За период госпитализации происходит смена взаимосвязей между микроорганизмами в сообществах, появляются новые корреляции между условно-патогенными и облигатными представителями, при этом длительная госпитализация детей в стационаре способствует контаминации ВДП грибами *Candida* ($r_s = 0,35$, $p = 0,008$), за счет *C.tropicalis* ($r_s = 0,35$, $p = 0,007$) и *S. 'milleri'* ($r_s = 0,30$, $p = 0,021$). При длительной госпитализации в стационаре у недоношенных детей происходит увеличение условно-патогенной флоры в толстой кишке и появление однотипных штаммов микроорганизмов в смежных биотопах (ВДП и МВС). Отмечен положительный момент в появлении отрицательной связи между бифидобактериями и грибами *Candida* зева, что свидетельствует о межмикробном антагонизме.

К возрасту 6 месяцев происходит практически полная смена межмикробных взаимодействий между представителями толстой кишки и микроорганизмами смежных биотопов. Большая часть статистически значимых связей отмечена с микробиотой МВС, что указывает на более тесный контакт данных биоценозов. Только к возрасту 12 месяцев появляются микробные взаимосвязи облигатной микробиоты, как внутри кишечного биотопа, так и со смежными микробиоценозами.

Факторный анализ основных показателей микробиоты организма ребенка

Учитывая сложный характер функционирования живых систем и множества факторов, влияющих на их формирование, нами проведен факторный анализ. В раннем неонатальном периоде факторный анализ показал влияние реанимационных мероприятий при госпитализации детей в ОРН, так в первом факторе были НГОБ, выявленные из всех основных биотопов организма недоношенного ребенка, при одновременной колонизации ГОЭБ (*S.odorifera*, *K.pneumoniae*). Наблюдалось позднее заселение толстой кишки лактобактериями, в сравнении с детьми без госпитализации в ОРН. Обнаружение дрожжеподобных грибов рода *Candida* не зависело от проводимых реанимационных мероприятий.

Недоношенный ребенок с ОНМТ и ЭНМТ в силу незрелости всех органов и систем вынужден длительное время находится на этапе выхаживания в стационаре, что может достигать несколько месяцев, и является немаловажным фактором в формировании микробиоты. Отмечено, что при госпитализации до 30 дней в толстой кишке заселяются лактобактерии (0,5), которые сосредоточены в первом факторе. В дальнейшем происходит заселение кишечника *E.faecalis* (0,8) – второй фактор; бифидобактериями (0,8) и КОС (0,6) – третий фактор. При госпитализации детей до 40 дней первый фактор представлен условно-патогенной флорой, преимущественно зева: *H.influenzae* (0,9), *S.pneumoniae* (0,9), *S.liquefaciens* (0,9) и *C.albicans* (0,9). В толстой кишке и МВС – *S.odorifera* (0,7), при отсутствии формирования облигатного пула. В группе детей при госпитализации до 50 дней в первом факторе сосредоточены как облигатные представители (*Bacteroides spp.* (0,7), *Clostridium spp.* (0,6), типичные эшерихии (0,6)), так и условно-патогенные представители (*K.pneumoniae* (0,8), *P.aeruginosa* (0,8)). Длительная госпитализация в стационаре (более 51 дня) способствует контаминации толстой кишки и зева условно-патогенными представителями: гемолизинпродуцирующими эшерихиями (0,9), *S.aureus* (0,9), *C.tropicalis* (0,6) и *M.catarrhalis* (0,9) при отрицательных значениях лактофлоры и типичных эшерихий (Рисунок 6).

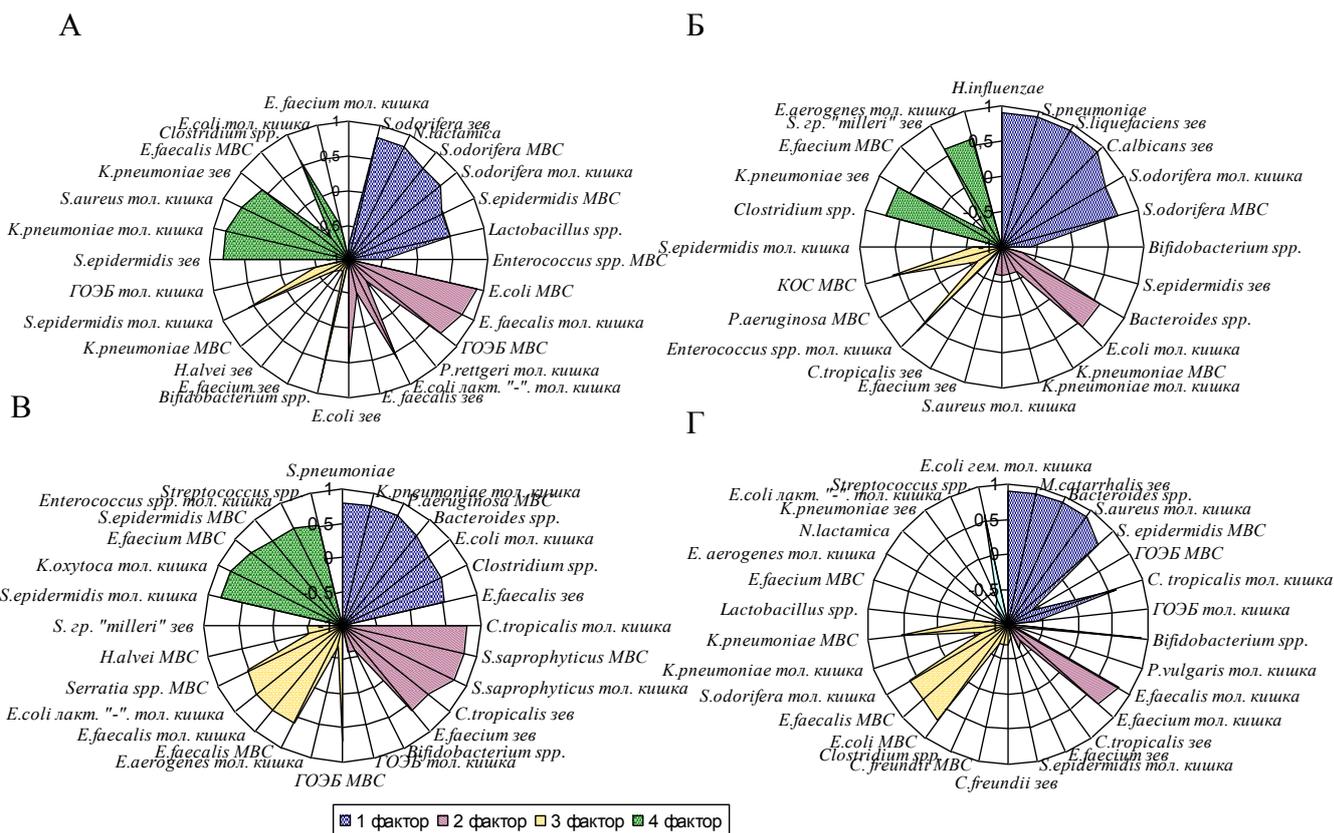


Рисунок 6 - Факторный анализ основных показателей микробиоты ВДП, МВС, толстой кишки у недоношенных детей на момент выписки из стационара от длительности госпитализации (А – до 30 дней, Б – 31-40 дней, В – 41-50 дней, Г – более 51 дня)

В возрасте 6 месяцев сохраняется напряженность микроэкологических показателей с преобладанием условно-патогенной флоры. К возрасту 1 года появляются антагонистические взаимосвязи между облигатными представителями толстой кишки, при сохранении значимой роли условно-патогенных представителей, что свидетельствует о появлении колонизационной резистентности нормофлоры.

У недоношенных детей высок риск развития воспалительных процессов, что требует широкого использования антибактериальной терапии. Антибиотики нарушают баланс микробиоты, меняют межвидовые отношения, что продемонстрировал факторный анализ микробиоты от количества групп антибактериальных препаратов. При использовании меньшего числа препаратов формируются конкурентные взаимоотношения в толстой кишке между облигатными представителями (типичными *E.coli* (0,6), *Bifidobacterium spp.* (0,5), *Bacteroides spp.* (0,5)) и *C.tropicalis* (-0,6). После использования массивной терапии в зеве формируются *Enterococcus spp.* (0,6) и грибы рода *Candida* (0,6) с подавлением α -зеленящих стрептококков (-0,6) и КОС (-0,6), а в МВС преобладание *P.aeruginosa* (0,5) над ГОЭБ. Следовательно, более выраженные изменения микробиоты отмечаются после массивной антибактериальной терапии, по всей видимости, за счет формирования антибиотикорезистентных условно-патогенных представителей (Рисунок 7).

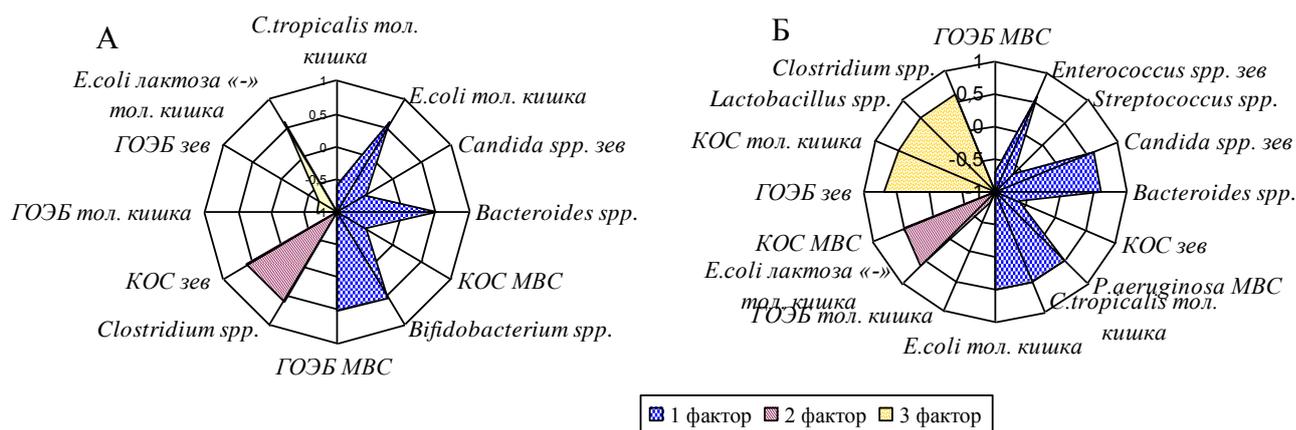


Рисунок 7 - Факторный анализ микрофлоры зева, МВС и толстой кишки от количества групп антибактериальных препаратов (А – 1 группа (1-3 групп препаратов); Б – 2 группа (4-6 групп препаратов))

За период длительной госпитализации в стационаре формируется контаминация основных биотопов резистентными микроорганизмами, так КОС были не чувствительны к цефокситину, эритромицину, гентамицину, ципрофлоксацину, при сохранении чувствительности к клиндамицину (76,2%). Энтерококки так же имели высокие уровни резистентности к ампициллину (54,2%), аминогликозидам (79,2%), фторхинолонам (60,9%), с сохранением чувствительности к ванкомицину. ГОЭБ демонстрировали резистентность к антимикробным препаратам от 8,5% (гентамицин) до 47,8% (цефтазидим), с сохранением чувствительности к карбапенемам (75,0%). Показано, что НГОБ (*P.aeruginosa*) имели высокий уровень резистентности к цефалоспорином, фторхинолонам, аминогликозидам и карбапенемам.

Можно утверждать, что у недоношенных детей, получающих массивную антибактериальную терапию на фоне длительной госпитализации в стационаре происходит постоянная сукцессия или последовательная смена микробных популяций в изучаемых экосистемах условно-патогенными микроорганизмами, чаще резистентными к антибиотикам.

В целом полученные в исследовании результаты показывают, что в раннем неонатальном периоде у недоношенных детей с очень низкой и экстремально низкой массой тела отмечается выраженный дефицит как облигатных, так и факультативных представителей основных микробиоценозов. Дефицит облигатных микроорганизмов является предпосылкой обсеменения условно-патогенными и патогенными представителями. Установлены основные факторы, влияющие на характер микрофлоры в биотопах, - это госпитализация в реанимационное отделение, массивная антибактериальная терапия и длительное пребывание в стационаре, на фоне которых замедляется процесс формирования облигатного пула. Оценивая динамику микробиологических проявлений можно констатировать, что к выписке из стационара происходит постепенное формирование микробиоты. Как показало наше динамическое исследование, у недоношенных детей с очень низкой и экстремально низкой массой тела к 12 месяцам не происходит полного формирования микробиоты толстой кишки, зева и мочевыделительной системы, поэтому необходим длительный микробиологический мониторинг данной группы детей. На основании полученных результатов нами были разработаны методические рекомендации (алгоритмы)

обследования и наблюдения детей с целью определения комплексного подхода динамического наблюдения за недоношенными детьми, что позволит определить вектор индивидуального обследования пациента, с учетом его клинического состояния и сократить время постановки диагноза и определения тактики лечения.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены нарушения микроэкологии желудочно-кишечного и респираторного тракта недоношенных детей с очень низкой и экстремально низкой массой тела на этапе выхаживания в стационаре, представленные дефицитом *Lactobacillus spp.* (91,4%), *Bifidobacterium spp.* (51,7%), *E.coli* (94,8%) в толстой кишке; зеленающих стрептококков (91,4%), *Lactobacillus spp.* в отделяемом зева, на фоне роста контаминации грамотрицательными энтеробактериями, преимущественно мочевыделительной системы (75,9%).
2. Установлено, что при динамическом наблюдении (в течении 12 месяцев) микробиота организма ребенка не сформирована с сохранением дефицита лактофлоры (43,1%) кишечника, особенно у детей с массой тела менее 1000гр и зеленающих стрептококков (46,6%) в зеве, на фоне микробной сукцессии и обнаружения высокой частоты представителей семейства *Enterobacteriaceae* (толстая кишка - 67,2%; мочевыделительная система – 50,0%).
3. С помощью корреляционного и факторного анализа определены значимые факторы, влияющие на процесс становления микрофлоры зева, мочевыделительной системы и желудочно-кишечного тракта недоношенных детей: лечение в реанимационном отделении, длительный период выхаживания в стационаре, особенно более 50 дней, с проведением антибактериальной терапии, что способствует контаминации условно-патогенными полирезистентными микроорганизмами.
4. Установлено, что антибактериальная терапия замедляет процесс формирования облигатной микрофлоры и способствует персистенции условно-патогенными представителями (*Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*, *P.aeruginosa*) основных биотопов недоношенных детей.
5. Разработанные алгоритмы микробиологического мониторинга микробиоты включают комплексное обследование недоношенных детей с массой тела менее 1500г на протяжении первого года жизни для своевременного выявления патологических состояний и повышения качества жизни растущего организма.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Рекомендована модифицированная схема бактериологического исследования фекалий с включением обследования цельного материала для выявления энтеробактерий (типичных эшерихий) и первого разведения для обнаружения бифидобактерий, лактобактерий, энтерококков, энтеробактерий, гемолитических форм микроорганизмов.

Обоснована необходимость микробиологического мониторинга контаминации основных биотопов (верхние дыхательные пути и толстая кишка) условно-патогенной флорой с определением их антибиотикочувствительности при переводе недоношенных детей с массой тела менее 1500г из отделения реанимации на этап выхаживания и при выписке детей из неонатального стационара.

Разработанные алгоритмы мониторинга микробиоты недоношенных детей с очень низкой и экстремально низкой массой тела на протяжении первого года жизни позволяют сформировать персонализированный подход к выявлению, адекватному лечению и предупреждению развития гнойно-септических инфекций.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Последующие исследования необходимо сосредоточить на молекулярно-генетической характеристике микрофлоры и внедрении масс-спектрометрического метода для расширения представления о микробиоте организма недоношенных детей с очень низкой и экстремально низкой массой тела в условиях города Архангельска.

Обоснована целесообразность разработки методических рекомендаций по обследованию и динамическому наблюдению за характером микробиоты основных биотопов у недоношенных детей с экстремально низкой массой тела в возрасте с 1 года до 3 лет.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Малыгина, О.Г.** Особенности формирования микробиоценоза основных биотопов «маловесных» детей в условиях стационара / **О.Г. Малыгина, Е.В. Лобанова** // Бюллетень Северного государственного медицинского университета. - 2010. - №1. - С. 52-53.
2. **Малыгина, О.Г.** Выявление внутриутробных инфекций методом ПЦР у детей с очень низкой массой тела / **О.Г. Малыгина, Т.А. Бажукова, Г.В. Симонова, В.С. Дьячкова, Е.В. Лобанова** // Молекулярная диагностика 2010: сб. тр. VII Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием в 3 т. - М., 2010. - Т. III. - Разд. 15. - С. 341-342.
3. **Малыгина, О.Г.** Особенности формирования микробиоценоза основных биотопов недоношенных детей / **О.Г. Малыгина, Т.А. Бажукова, Е.В. Лобанова, Г.Н. Чумакова** // Научные и прикладные аспекты концепции здоровья и здорового образа жизни : науч. тр. XI междунар. конгр. «Здоровье и образование в XXI веке» (Москва, 8-12 декабря 2010 года). – Москва, 2010. - С. 148-149.
4. **Малыгина, О.Г.** Влияние антибиотикотерапии на формирование микробиоценоза кишечника недоношенных детей / **О.Г. Малыгина, Е.В. Лобанова** // Медицинский академический журнал. – 2010. – Т. 10, №5. - С. 87-88.
5. **Малыгина, О.Г.** Особенности формирования микробиоценоза толстой кишки у недоношенных детей на фоне приема пробиотиков / **О.Г. Малыгина, Т.А. Бажукова, Е.В. Лобанова** // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2011. – № 2-3. – С. 56. – (Материалы 13-го Международного Славяно-Балтийского форума «Санкт-Петербург-Гастро-2011», СПб., 18-20 мая 2011 г.).
6. **Малыгина, О.Г.** Особенности формирования микробиоценоза толстой кишки у недоношенных детей на фоне внутриутробной инфекции / **О.Г. Малыгина, Т.А. Бажукова, Г.В. Симонова, В.С. Дьячкова, Е.В. Лобанова** // Инфекция и иммунитет. – 2012. – Т. 2, № 1-2. – С. 295.
7. Лепешкин, С.Ю. Частота выявления перинатальных патогенов у недоношенных новорожденных с низкой массой тела методом ПЦР / С.Ю. Лепешкин, **О.Г. Малыгина** // Бюллетень Северного государственного медицинского университета. – 2012. - №1. - С. 49-50.
8. **Малыгина, О.Г.** Формирование микробиоценоза толстой кишки у недоношенных детей с низкой и экстремально низкой массой тела в условиях стационара / **О.Г. Малыгина, Т.А. Бажукова, Е.В. Лобанова, Г.Н. Чумакова** // Экология человека. – 2013. - №3. - С. 28-33.
9. **Малыгина, О.Г.** Формирование микробиоценоза мочи у недоношенных детей в условиях стационара / **О.Г. Малыгина, Т.А. Бажукова** // Российский север: перспективы, долгосрочные прогнозы, управление рисками: материалы IX Северного социально-экологического конгресса (Архангельск, 26–28 сентября 2013 года). – Архангельск, 2013. - С. 105-107.

10. Малыгина, О.Г. Влияние антибиотиков на формирование микроэкологии у недоношенных детей с низкой и экстремально низкой массой тела при рождении / О.Г. Малыгина, Т.А. Бажукова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2014. - №1. - С. 61-65.
11. Малыгина, О.Г. Формирование микробиоценоза ротоглотки у недоношенных детей с низкой и экстремально низкой массой тела при рождении в условиях детского стационара / О.Г. Малыгина, Т.А. Бажукова, Г.В. Симонова // Экология человека. – 2014. - № 12. - С. 9-14.
12. Малыгина О.Г. Распространение *Candida spp.* у недоношенных детей в условиях стационара / О.Г. Малыгина, Т.А. Бажукова // Проблемы медицинской микологии. – 2015. – Т. 17, № 2. – С. 105.
13. Малыгина О.Г. Особенности микрофлоры основных биотопов у недоношенных детей с очень низкой и экстремально низкой массой тела при рождении на фоне внутриутробного инфицирования / О.Г. Малыгина, Т.А. Бажукова // Молекулярная диагностика 2017: сб. тр. IX Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием в 2 т. - М., 2017. - Т. 1. - Разд. 8. - С. 399-400.
14. Малыгина, О.Г. Становление микробиоценоза толстой кишки у недоношенных детей с очень низкой и экстремально низкой массой тела на первом году жизни / О.Г. Малыгина, Т.А. Бажукова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2018. - № 5. - С. 60-66.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВДП – верхние дыхательные пути

ГБУЗ АО «АДКБ» - Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Архангельской области «Архангельская областная детская клиническая больница имени П.Г. Выжлецова»

ГОЭБ – грамотрицательные энтеробактерии

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

КОС – коагулазоотрицательные стафилококки

МВС – мочевыделительная система

НГОБ – неферментирующие грамотрицательные бактерии

ОКБ – общее количество бактерий

ОНМТ – очень низкая масса тела

ОРН – отделение реанимации новорожденных

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ФГБОУ ВО СГМУ (г.Архангельск) Минздрава России - федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

ЭНМТ – экстремально низкая масса тела