

МИКРОБИОТА КИШЕЧНИКА ЗДОРОВЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ: НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДИАГНОСТИКИ — НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА ПРОЦЕСС СТАНОВЛЕНИЯ

Т. В. Припутневич¹, Е. Л. Исаева¹, В. В. Муравьева¹, А. Б. Гордеев¹✉, В. В. Зубков¹, Л. А. Тимофеева¹, М. К. Месян¹, Е. Шубина¹, В. В. Макаров², С. М. Юдин²

¹ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова, Москва, Россия

² Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью, Москва, Россия

В настоящее время не существует критериев адекватной оценки качественного и количественного состава микробиоты кишечника новорожденных детей, что не дает возможности выявить на ранних сроках патологический процесс и скорректировать его. Целью исследования было изучить становление микробиоты кишечника у здоровых новорожденных в городе Москве, рожденных самопроизвольно и путем операции кесарева сечения, с помощью методов культуромики, протеомики и молекулярно-генетических технологий. Обследовано 66 детей: 33 ребенка, рожденных самопроизвольно, и 33 — путем операции кесарева сечения. Образцы просветной микрофлоры собирали на первые, седьмые и 30-е сутки жизни. Выделено 136 видов микроорганизмов, относящихся к 40 родам. Показано, что кесарево сечение тормозит процесс нормального становления микрофлоры кишечника, и в течение изучаемого периода (первого месяца жизни) микробиоценоз кишечника у таких детей не достигает показателей у детей, рожденных самопроизвольно. Статистически достоверно в группе самопроизвольных родов преобладали бифидобактерии (частота их встречаемости в титре 10^9 – 10^{12} КОЕ/г составила 84% против 33% при титре 10^5 – 10^{12} КОЕ/г в группе кесарева сечения). В то же время у детей, рожденных самопроизвольно, по сравнению с детьми, рожденными путем кесарева сечения, отмечена статистически достоверно более низкая частота обнаружения клостридий (33,3 и 65,4% соответственно) и лактозоотрицательных штаммов *Escherichia coli* (2,4 и 19,4% соответственно).

Ключевые слова: микробиота, новорожденные, микробиота кишечника

Информация о вкладе авторов: Т. В. Припутневич — планирование исследования, организация микробиологических исследований, интерпретация данных; Е. Л. Исаева и В. В. Муравьева — проведение микробиологических исследований, подготовка черновика рукописи; А. Б. Гордеев — анализ и интерпретация данных; В. В. Зубков — планирование исследования, организация сбора проб фекалий; Л. А. Тимофеева и М. К. Месян — сбор проб фекалий; Е. Шубина — проведение секвенирования; В. В. Макаров и С. М. Юдин — планирование исследования.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова (протокол заседания № 4 от 12 апреля 2018 г.). Родители всех детей, включенных в исследование, подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Алексей Борисович Гордеев
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117997; gordeew@vega.protres.ru

Статья получена: 28.08.2019 **Статья принята к печати:** 11.09.2019 **Опубликована онлайн:** 28.09.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.063

GUT MICROBIOTA OF HEALTHY NEWBORNS: NEW DIAGNOSTIC TECHNOLOGIES — NEW OUTLOOK ON THE DEVELOPMENT PROCESS

Pripitnevich TV¹, Isaeva EL¹, Muravieva VV¹, Gordeev AB¹✉, Zubkov VV¹, Timofeeva LA¹, Mesyan MK¹, Shubina E¹, Makarov VV², Yudin SM²

¹ National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V. I. Kulakov, Moscow, Russia

² Center for Strategic Planning and Management of Medical and Biological Health Risks, Moscow, Russia

Currently, there are no criteria allowing to adequately assess composition and volume of the newborns' gut microbiota, which prevents early detection of the pathological processes and appropriate intervention. This study aimed to apply the methods of culturomics, proteomics and molecular genetic technologies to investigate the development of gut microbiota in healthy newborns delivered in the city of Moscow both vaginally and through a cesarean section. We examined 66 children, 33 of them delivered vaginally and 33 by cesarean section. The luminal bacterial flora samples were collected on the 1st, 7th and 30th days of life. There were 136 species of microorganisms belonging to 40 genera identified. We established that cesarean section slows down normal development of the gut microflora: through the follow-up period (1 month of life), gut microbiocenosis in such children did not yield the results on par with those registered in children born vaginally. Bifidobacteria were significantly more common in the vaginal delivery group: 84% of 10^9 – 10^{12} CFU/g versus 33% of 10^5 – 10^{12} CFU/g in the cesarean section group. At the same time, the former group had significantly less clostridia (33.3% and 65.4%, respectively) and lactose-negative *Escherichia coli* strains (2.4 and 19.4%, respectively) than the latter group.

Keywords: microbiota, newborns, gut microbiota

Author contribution: Pripitnevich TV — study planning, organization of microbiological tests, data interpretation; Isaeva EL and Muravieva VV — conducting microbiological tests, draft authoring; Gordeev AB — data analysis and interpretation; Zubkov VV — study planning, feces samples collection organization; Timofeeva LA and Mesyan MK — feces collection; Shubina E — sequencing; Makarov VV and Yudin SM — study planning.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V. I. Kulakov (meeting minutes № 4 of April 12, 2018). Parents of all children included in the study signed the voluntary informed consent to participate in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexey B. Gordeev
Akademika Oparina, 4, Moscow, 117997; gordeew@vega.protres.ru

Received: 28.08.2019 **Accepted:** 11.09.2019 **Published online:** 28.09.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.063

В современных условиях характер микробной колонизации кишечника, в том числе у новорожденных детей, претерпел существенные изменения в связи с увеличением контингента женщин с осложненным течением беременности, возрастанием стрессовых воздействий, экологическим

неблагополучием и бесконтрольным применением антибиотиков.

Углубленное изучение кишечной микробиоты с использованием возможностей культуромики, высокотехнологичных методов идентификации выделенных

микроорганизмов (MALDI-TOF MS, секвенирования последовательностей гена 16S рПНК), а также современных технологий метагеномного анализа позволяет значительно расширить представление о ее видовом многообразии.

Принятые в настоящее время нормативы по качественному и количественному составу микробиоты кишечника [1–3] на этом фоне требуют корректировки. На сегодняшний день отсутствуют четко разработанные критерии оценки состояния микробиоты кишечника новорожденных, которые позволили бы своевременно корректировать выявленные нарушения и на ранних этапах влиять на патологический процесс, например развитие некротизирующего энтероколита у недоношенных детей. Существует крайне мало работ, в которых представлены статистически обработанные данные по качественному и количественному составу микробиоты кишечника новорожденных детей [4, 5].

Целью исследования было с помощью методов культуромикологии, протеомикологии и молекулярно-генетических технологий оценить становление микробиоты кишечника у здоровых новорожденных в городе Москве, рожденных самопроизвольно и путем операции кесарева сечения.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Проспективное исследование выполняли на когорте здоровых доношенных новорожденных. Рандомизацию проводили блочным методом, в результате которого были сформированы две группы детей:

- 1) группа I — 33 ребенка, родившихся самопроизвольно;
- 2) группа II — 33 ребенка, родившихся путем операции кесарева сечения.

Детей отбирали согласно следующим критериям включения в исследование: гестационный возраст — 38–40 недель; оценка по шкале Апгар на первой и пятой минутах жизни — 8–9 баллов; масса тела — более 2800 г. Всем новорожденным выполняли клинические анализы крови и мочи для исключения инфекционной патологии или других факторов, способных повлиять на формирование микробиоты кишечника. Все дети находились на грудном вскармливании, и в единичных случаях детей докармливали искусственными смесями. У всех матерей не было отмечено длительного безводного промежутка; антибиотиков во время беременности принимали три женщины; истмико-цервикальная недостаточность имела место у четырех женщин (6%). В случае оперативного родоразрешения женщины получали амоксициллин в качестве антибиотикопрофилактики до и во время операции.

У новорожденных проводили трехкратный отбор проб фекалий: в первые сутки, конце первой недели и конце первого месяца жизни. Образцы мекония, полученного во время первой дефекации, или кала, собранные со стерильной пеленки в стерильный пластиковый контейнер, в течение 2 ч доставляли в лабораторию и незамедлительно приступали к посеву.

Изучение состава микробиоты кишечника новорожденных проводили с использованием расширенного спектра селективных и неселективных питательных сред и инкубированием в аэробных, микроаэрофильных и анаэробных условиях.

Посев мекония и кала проводили согласно принятым методикам [3, 6] на следующие питательные среды. Для выделения факультативно-анаэробных и аэробных микроорганизмов использовали колумбийский кровяной агар, хромогенную среду Brilliance, сальмонелла-шигелла-

агар, декстрозный агар Сабуро (Oxoid; Великобритания), маннит-солевой агар (Himedia; Индия), среду для выявления и дифференциации *Streptococcus agalactiae* (CHROMagar; Франция), энтерококковый агар, агар Эндо (ФГУН «ГИЦПМ и Б»; Россия). Лактобациллы культивировали на среде лактобакагар (ФГУН «ГИЦПМ и Б»; Россия). Строгие анаэробы выделяли на агаре для бифидобактерий (Himedia; Индия), прередуцированном агаре Шедлера с необходимыми добавками, основном агаре для анаэробов, перфрингенс агаре, железосульфитном агаре, селективном агаре для *Clostridium difficile* (Oxoid; Великобритания). Для культивирования микроаэрофилов использовали CO₂-инкубатор (Jouan; Франция) с концентрацией CO₂ 5%. Строгие анаэробы культивировали в анаэробном боксе (Jouan; Франция) в атмосфере трехкомпонентной газовой смеси (N₂ — 80%; CO₂ — 10%; H₂ — 10%). Для контроля стерильности использовали тиогликолевый бульон (Oxoid; Великобритания).

Идентификацию микроорганизмов осуществляли с помощью времяпролетного MALDI-TOF масс-спектрометра AutoFlex III с программным обеспечением Maldi BioTyper (Bruker Daltonics; Германия) версии 3.0. При получении значений SCORE > 2,0 культуру считали с высокой вероятностью идентифицированной до вида. При значениях SCORE в диапазоне 1,7–2,0 культуру считали идентифицированной до рода.

Для всех трудноидентифицируемых штаммов (при значении SCORE < 2,0) проводили секвенирование последовательностей гена 16S рПНК. ДНК культур выделяли с использованием набора реагентов для выделения ДНК «Проба-ЦитО» («ДНК-технология»; Россия). Для секвенирования использовали два фрагмента ДНК: ампликон длиной ~440 п. н., соответствующий позициям 339–785 гена 16S рПНК, и ампликон длиной ~1340 п. н., соответствующий позициям 42–1380 гена 16S рПНК. Амплификацию проводили с использованием детектирующего амплификатора ДТпрайм («ДНК-технология»; Россия). Секвенирование осуществляли на приборе 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems; США) с использованием набора BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems; США) согласно протоколу производителя. Для видовой идентификации использовали свободно доступный в Интернете программный пакет BLAST (National Center for Biotechnology Information; США).

При статистической обработке данных для определения различий в частоте встречаемости микроорганизмов в зависимости от способа родоразрешения использовали точный тест Фишера. В качестве описательной статистики для характеристики степени микробной обсемененности использовали медиану и интерквартильное расстояние (ИКР).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В первой временной точке обследовано 66 детей, по 33 ребенка из каждой группы. У каждого пятого ребенка меконий оказался стерильным, причем у детей II группы в 2 раза чаще по сравнению с I группой (9 и 4 соответственно; $p > 0,05$). У детей с положительными результатами посевов мекония выделена разнообразная микрофлора (63 вида, средний показатель видового разнообразия составил 3,8 вида на одного ребенка). Наиболее часто (в 60% случаев в титре 10²–10³ КОЕ/г после самопроизвольных родов и в 70% случаев в титре 10²–10⁴ КОЕ/г — после операции) выделяли грамположительные факультативно-

анаэробные микроорганизмы, представленные 10 родами: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Gemella*, *Globicatella*, *Granulicatella*, *Rothia*; *Corynebacterium*, *Bacillus*. Обращает на себя внимание, что у 12,2% детей II группы и у 6,1% детей I группы обнаружен *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). *Escherichia coli*, в норме составляющая значительную часть нормофлоры кишечника, при самопроизвольных родах выделена почти в 3 раза чаще (24,2 и 9,1%; $p > 0,05$). Прочие энтеробактерии также чаще выделяли у детей I группы (27 и 15% соответственно; $p > 0,05$). *Pseudomonas aeruginosa* обнаружена только у одного ребенка II группы.

Наиболее важную роль в становлении микробиоты кишечника новорожденного играют лактобациллы и бифидобактерии. Эти микроорганизмы обнаружены уже в первые сутки жизни. В группе I колонизация кишечника лактобациллами оказалась значительно выше (18 и 3% соответственно; $p > 0,05$), и это были *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus jensenii*, относящиеся к числу доминирующих видов в вагинальной микробиоте здоровых женщин. Бифидобактерии также чаще выделяли у детей I группы (9 и 3% соответственно; $p > 0,05$). Ими оказались *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*. Бактероиды в первые сутки жизни обнаружили лишь у одного ребенка I группы. Прочие анаэробы (вейлонеллы, превотеллы и кампилобактеры) выделяли практически только во II группе.

Ввиду отказа некоторых родителей от участия в исследовании или возникновения инфекционного заболевания часть детей выбыла из исследования в течение первой недели жизни, и во второй точке было обследовано 52 ребенка: 25 детей из I группы и 27 детей из II группы.

Средний показатель видового разнообразия возрос по сравнению с первой точкой почти в 3 раза и составил 9,4 вида на одного ребенка. Как и в первые сутки жизни, в обеих группах наиболее часто встречались грамположительные факультативно-анаэробные микроорганизмы (9 родов). Их титр заметно вырос: после естественных родов — до 10^7 – 10^{11} , после кесарева сечения — до 10^7 – 10^{12} КОЕ/г, а частота встречаемости составила 100% в обеих группах. Увеличилась частота выделения *S. aureus*: у 44% детей I группы и у 55,6% детей II группы. Расширилась представленность энтерококков с двух до шести видов: *Enterococcus faecalis*, *E. durans*, *E. faecium*, *E. gilvus*, *E. avium*, *E. gallinarum*. Доминирующую позицию, как и в первые сутки жизни, занимал *E. faecalis*, колонизировавший кишечник большей части новорожденных в обеих группах (80% — в I группе и 88,9% — во II группе).

Видовой спектр грамотрицательной факультативно-анаэробной микрофлоры расширился с 6 до 15 видов, относящихся к семейству *Enterobacteriaceae*. *E. coli* при самопроизвольных родах по-прежнему выделяли чаще (64% — в I группе и 44,4% — во II; $p > 0,05$). Прочие энтеробактерии высевали примерно с одинаковой частотой в обеих группах.

Видовой состав лактобацилл обогатился новыми видами: *L. paracasei*, *L. curvatus*, *L. gasseri*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*. Необходимо отметить, что виды лактобацилл, доминирующие в вагинальной микробиоте здоровых женщин (*L. crispatus*, *L. jensenii* и *L. gasseri*), обнаружены только в I группе.

Статистически достоверные различия наблюдали в представленности бифидобактерий. Если в группе I частота их встречаемости составила 84%, а титр

находился в диапазоне 10^9 – 10^{12} КОЕ/г, то во II группе бифидобактерии выделены только у 33% в титрах 10^5 – 10^{12} КОЕ/г ($p < 0,05$). Видовой спектр бифидобактерий расширился с 3 до 7 видов: *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. dentium*, *B. catenulatum*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. animalis*. Некоторые виды обнаружены только в одной из групп: *B. adolescentis* и *B. catenulatum* (только в I группе) и *B. dentium* и *B. animalis* (только во II группе).

К седьмым суткам жизни микробиота в значительной степени обогатилась за счет прочих облигатных анаэробов (11 родов): *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Veillonella*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*, *Eggerthella*, *Actinomyces*, *Collinsella*, *Propionibacterium*. При этом бактериоиды, представленные *Bacteroides fragilis*, *B. ovatus*, *B. vulgatus*, *B. uniformis*, *Parabacteroides distasonis*, выделены только у детей, рожденных самопроизвольно. Существенной разницы в частоте обнаружения клостридий (*Clostridium perfringens*, *C. butyricum*, *C. innocuum*, *C. tertium*) не выявлено. У одного ребенка II группы выделен штамм *C. difficile*. В обеих группах возросла колонизация кишечника вейлонеллами.

Таким образом, к седьмым суткам жизни существенно увеличилось видовое разнообразие, касающееся различных групп микроорганизмов, как факультативно-анаэробного, так и облигатно-анаэробного происхождения. Бифидобактерии, лактобациллы и бактериоиды преобладали в группе I.

В третьей точке обследовано 50 детей: 24 ребенка из группы I и 26 детей из группы II. Средний показатель видового разнообразия составил 10,1 вида на одного ребенка. Как и в более ранние периоды, наиболее представленной была группа грамположительных факультативно-анаэробных микроорганизмов (7 родов). Частота выделения *S. aureus* мало изменилась в сравнении с седьмыми сутками в I группе (58,3%) и значительно выросла во II группе (76,9%). Видовой состав энтерококков пополнился еще двумя видами: *E. casseliflavus* и *E. raffinosus*.

В составе грамотрицательной факультативно-анаэробной микрофлоры выявлено 11 видов из семейства *Enterobacteriaceae* и один вид неферментирующих бактерий — *Stenotrophomonas maltophilia*. *E. coli* при самопроизвольных родах по-прежнему выделялась чаще (75% в I группе и 61,5% — во II; $p > 0,05$). Прочие энтеробактерии несколько чаще высевали у детей II группы (66,7 и 73% соответственно; $p > 0,05$).

Видовой состав лактобацилл расширился до 15 видов за счет *L. reuteri*, *L. casei*, *L. vaginalis*, *L. brevis*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, причем в I группе выделяли почти вдвое большее количество видов. Видовой спектр бифидобактерий увеличился на один вид *B. ruminantium*. Наиболее часто выделяли *B. longum* (58,3% в I группе и 26,9% — во II) и *B. bifidum* (33,3 и 34,6% соответственно).

Облигатные анаэробы пополнились родами *Sutterella* и *Peptoniphilus*. Бактероиды (6 видов), представленные *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. vulgatus*, *B. uniformis*, *B. cellulosilyticus*, *Parabacteroides distasonis*, за исключением одного случая после кесарева сечения, выделены только у детей, рожденных путем самопроизвольных родов.

Наметилась статистически достоверная разница в частоте обнаружения клостридий (*C. perfringens*, *C. butyricum*, *C. tertium*, *C. ramosum*, *C. paraputrificum*, *C. difficile*): у 33,3% детей в I группе и 65,4% — во II ($p < 0,05$). Во II группе выделено в 2 раза больше видов клостридий. У одного ребенка II группы выделен *C. difficile*.

Дрожжевые грибы рода *Candida* обнаружены в обеих группах только на 30-е сутки жизни менее чем у 10% детей.

Таким образом, на 30-е сутки жизни микробиота кишечника вне зависимости от способа родоразрешения представлена поликомпонентными ассоциациями микроорганизмов, относящихся к факультативным и облигатным анаэробам. В то же время наметились определенные различия, касающиеся облигатной и транзитной составляющей микробиоты. Так, при самопроизвольном родоразрешении видовой состав лактобацилл был более разнообразным (почти вдвое большее количество видов), чаще выявляли виды, колонизирующие влагалище здоровых женщин. Бактероиды были преимущественно выделены у детей, рожденных самопроизвольно, а клостридии при большем видовом разнообразии, напротив, у детей, рожденных путем операции кесарева сечения. Условно-патогенные факультативные анаэробы (*S. aureus* и энтеробактерии, за исключением *E. coli*) чаще колонизировали детей, рожденных оперативным путем.

Гемолитические штаммы *Enterococcus sp.* и *E. coli* в обеих группах детей встречались с одинаковой частотой: *Enterococcus sp.* соответственно по 8,3% в каждой группе и *E. coli* — 9,5 и 9,7% соответственно. Лактозоотрицательные штаммы *E. coli* статистически достоверно чаще (в 8 раз) выделяли у детей II группы (19,4 и 2,4% соответственно; $p < 0,05$).

Суммарно в процессе исследования было выделено и идентифицировано 136 видов микроорганизмов, относящихся к 40 родам: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Rothia*, *Bacillus*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Gemella*, *Globicatella*, *Granulicatella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Raoultella*, *Kluyvera*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Morganella*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Candida*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Propionibacterium*, *Veillonella*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Eggertella*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Actinomyces*, *Collinsella*, *Prevotella*, *Campylobacter*, *Peptoniphilus*, *Sutterella*.

Для уточнения видовой принадлежности 36 изолятов бактерий (SCORE < 2,0) потребовалось секвенирование гена 16S рПНК. Для большинства изолятов результаты секвенирования гена 16S рПНК совпали с результатами MALDI-TOF масс-спектрометрии. Лишь для 5 изолятов достоверную идентификацию удалось получить только методом секвенирования гена 16S рПНК. В ряде случаев точную видовую принадлежность близкородственных микроорганизмов установить не удалось при использовании обоих методов. К таким видам относились: *Bifidobacterium kashiwanohense*/*Bifidobacterium pseudocatenulatum*/*Bifidobacterium catenulatum*, *Lactobacillus casei*/*Lactobacillus paracasei*, *Actinomyces naeslundii*/*Actinomyces viscosus*, *Actinomyces radingae*/*Actinomyces ihumii*. Расхождение идентификации касалось 11 изолятов: для 7 изолятов методом MALDI-TOF масс-спектрометрии не удалось правильно определить родовую принадлежность микроорганизмов и для 4 изолятов — видовую.

Обобщенные данные по частоте встречаемости и степени микробной обсемененности кишечника новорожденных в зависимости от способа родоразрешения, позволяющие в первом приближении охарактеризовать показатели микрофлоры здоровых детей, представлены в таблице.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

До недавнего времени считалось, что желудочно-кишечный тракт новорожденного стерилен в течение

10–20 ч (асептическая фаза) [7], а первичная микробная колонизация при самопроизвольных родах осуществляется за счет микрофлоры влагалища матери, основу которой составляют лактобациллы [8–11]. Между тем появилась и другая точка зрения, основанная на результатах экспериментальных работ [12]. Из недавно опубликованных данных следует, что нормальная микрофлора кишечника у плода закладывается во второй половине беременности от матери при помощи феномена бактериальной транслокации, и утверждение о том, что плод находится в стерильных условиях, оспаривается рядом ученых [13–15]. В нашем исследовании меконий, полученный во время первого акта дефекации в первые часы жизни, был нестерилизован у 53 из 66 новорожденных (80%), что не исключает внутриутробной колонизации.

По данным литературы, в первые часы и сутки жизни происходят активная колонизация и рост кишечной палочки, энтерококков (стадия «нарастающей колонизации»), что не зависит от степени зрелости, перинатальных условий развития плода и вида вскармливания [16–19]. Титр энтеробактерий в этот период достигает 10^9 КОЕ/г фекалий [20], тогда как анаэробы — бифидобактерии, лактобациллы, бактериоиды — обычно отсутствуют [21]. Наши данные свидетельствуют, что в первые часы жизни кишечника колонизировали в основном грамположительные кокки (*Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*), причем в большей степени после операции кесарева сечения, чем после родов (частота встречаемости 70 и 60,6%, титры — до 10^4 и 10^3 КОЕ/г соответственно). Энтеробактерии и облигатно-анаэробные микроорганизмы в этот период времени выявляли редко и в низком титре. Вместе с тем, уже в первые часы жизни в составе микробиоты у детей, рожденных естественным путем, чаще, чем при кесаревом сечении, обнаружены бифидобактерии (9 и 3% соответственно) и лактобациллы (18 и 3% соответственно). Только у 3% детей, рожденных самопроизвольно, обнаружены бактериоиды. Возможной причиной расхождения наших данных с результатами других авторов является то, что мы старались получить биоматериал непосредственно во время первого акта дефекации новорожденного.

В дальнейшем у здоровых младенцев идет активный рост анаэробной и факультативно-анаэробной составляющей микрофлоры в количествах 10^5 – 10^7 КОЕ/г [15]. К шестым суткам устанавливается равновесие аэробной и анаэробной частей микрофлоры, далее происходит нарастание лакто- и бифидофлоры, и к 2 месяцам жизни она достигает значений 10^9 – 10^{10} КОЕ/г. По данным других авторов, с 3–5 дня наступает стадия «трансформации микрофлоры», в результате которой происходит вытеснение бифидофлорой других микроорганизмов. В этот период бифидобактерии становятся основной (резидентной) микрофлорой кишечника [22–24]. Доминирующее положение бифидофлора начинает занимать к 5–20-му дню жизни [25]. Наши данные к 7-м суткам жизни имеют определенные отличия: общее количество микроорганизмов возрастает, достигая 10^{10-12} КОЕ/г. Это свидетельствует о том, что равновесие факультативно-аэробной и облигатно-анаэробной составляющих микробиоты также наступает к первой неделе, но при более высокой степени микробной колонизации кишечника различными микроорганизмами. Обращает на себя внимание то, что при кесаревом сечении наблюдалось отставание колонизации кишечника

Таблица. Частота встречаемости, медиана и ИКР степени обсемененности фекалий микроорганизмами

Характеристика	1-е сутки жизни (n = 66)		7-е сутки жизни (n = 52)		1-й месяц жизни (n = 50)	
	Роды	Кесарево сечение	Роды	Кесарево сечение	Роды	Кесарево сечение
<i>E. coli</i>						
Частота встречаемости	24%	9%	64%	44,40%	70,80%	61,50%
Медиана (КОЕ/г)	10 ²	10 ²	10 ⁸	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹
ИКР (КОЕ/г)	10 ²	10 ² -10 ³	10 ⁸ -10 ⁹	10 ⁸ -10 ¹⁰	10 ⁸ -10 ¹⁰	10 ⁸ -10 ¹⁰
Другие энтеробактерии						
Частота встречаемости	27%	15%	68%	66,70%	66,70%	73%
Медиана (КОЕ/г)	10 ³	10 ³	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹
ИКР (КОЕ/г)	10 ² -10 ⁴	10 ² -10 ³	10 ⁸ -10 ¹⁰	10 ⁹ -10 ¹⁰	10 ⁸ -10 ¹⁰	10 ⁹ -10 ¹⁰
Грамположительные факультативно-анаэробные и аэробные бактерии						
Частота встречаемости	60,60%	70%	100%	100%	100%	100%
Медиана (КОЕ/г)	10 ²	10 ²	10 ⁸	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁹
ИКР (КОЕ/г)	10 ²	10 ² -10 ³	10 ⁸ -10 ¹⁰	10 ⁸ -10 ¹⁰	10 ⁷ -10 ⁹	10 ⁷ -10 ⁹
Бифидобактерии						
Частота встречаемости	9%	3%	84%	33%	83,30%	53,80%
Медиана (КОЕ/г)	10 ²	10 ²	10 ¹¹	10 ¹⁰	10 ¹¹	10 ¹⁰
ИКР (КОЕ/г)	10 ² -10 ³	10 ²	10 ⁹ -10 ¹¹	10 ⁸ -10 ¹¹	10 ¹⁰ -10 ¹²	10 ¹⁰ -10 ¹¹
Лактобациллы						
Частота встречаемости	18%	3%	28%	37%	58,30%	69%
Медиана (КОЕ/г)	10 ²	10 ²	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸
ИКР (КОЕ/г)	10 ²	10 ²	10 ⁶ -10 ¹⁰	10 ⁶ -10 ¹⁰	10 ⁵ -10 ¹⁰	10 ⁷ -10 ¹⁰
Бактероиды						
Частота встречаемости	3%	0	32%	0	25%	3,80%
Медиана (КОЕ/г)	10 ²	0	10 ⁹	0	10 ¹⁰	10 ⁹
ИКР (КОЕ/г)	10 ²	0	10 ⁹ -10 ¹¹	0	10 ¹⁰	10 ⁹
Клостридии						
Частота встречаемости	0	0	32%	40,70%	33,30%	65,40%
Медиана (КОЕ/г)	0	0	10 ⁷	10 ⁹	10 ^{10,5}	10 ^{9,5}
ИКР (КОЕ/г)	0	0	10 ⁶ -10 ⁹	10 ⁶ -10 ¹⁰	10 ⁶ -10 ¹¹	10 ⁸ -10 ¹⁰

бифидобактериями и преобладание прочих строгих анаэробов (в основном вейлонелл, клостридий).

К концу первого месяца жизни анаэробная часть микробиоты заняла лидирующее положение с доминированием бифидофлоры в обеих группах. Тем не менее после кесарева сечения бифидофлора была выявлена лишь у половины детей, тогда как после самопроизвольных родов этот показатель достиг 83%.

Характерные для детей первого года жизни *B. longum subsp. infantis*, *B. animalis subsp. lactis*, *B. breve*, *B. bifidum* обладают противовоспалительным действием и способствуют формированию Th1-иммунного ответа. Преобладающие штаммы бифидобактерий у взрослых — *B. longum subsp. longum*, *B. adolescentis*, *B. pseudocatenulatum* — способствуют Th2-иммунному ответу и превалируют в микробиоте кишечника при ожирении [24]. Кроме того, *B. longum subsp. infantis* отличается наличием в геноме кластера, кодирующего синтез ферментов (сиалидазы, фукозидазы, N-ацетил-β-гексозаминидазы и β-галактозидазы), расщепляющих олигосахариды до моносахаридов [25]. Бифидофлора кишечника в течение всей жизни остается превалирующей и

является апатогенной, в то время как иные представители облигатной микрофлоры при определенных условиях могут стать причиной заболевания [13]. Полученные нами результаты показали, что после операции кесарева сечения у новорожденных доминируют не самые полезные виды бифидобактерий, в частности, не способные расщеплять лактозу (*B. animalis*, *B. dentium*, *B. ruminantium*).

ВЫВОДЫ

Полученные нами результаты подтверждают, что оперативное родоразрешение в определенной степени сдерживает процесс нормального становления микробиоты кишечника. В дальнейшем мы планируем продолжить накапливать информацию о состоянии микробиоты у данной категории детей и расширить исследование, включив в него недоношенных детей, с целью определения критериев нормы кишечной микробиоты здоровых доношенных новорожденных. Проведенное исследование позволило создать, а в перспективе пополнять коллекцию лактобацилл и бифидобактерий, выделенных у здоровых доношенных новорожденных для

выявления бактерий — претендентов в пробиотические штаммы. Своевременная адекватная оценка состава микробиоты новорожденных по показателям ключевых биомаркеров позволит проводить направленную

профилактику ближайших и отдаленных последствий перинатальной патологии у доношенных и недоношенных новорожденных путем ее коррекции с использованием адекватной композиции пробиотиков.

Литература

1. ОСТ 91500.11.0004-2003. Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника. Утв. Приказом МЗ РФ № 231 от 09.06.2003. Москва, 2003; 173 с.
2. Методические рекомендации «Бактериологическая диагностика дисбактериоза кишечника». Минздрав РСФСР. 1977.
3. Методические рекомендации «Микробиологическая диагностика дисбактериоза кишечника». Москва, 2007.
4. Gronlund MM, Arvilommi H, Kero P, Lehtonen OP, Isolauri E. Importance of intestinal colonization in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0–6 months. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*. 2000; 83 (3): 186–92.
5. Леванова Л.А. Микроэкология кишечника жителей Западной Сибири, коррекция дисбиотических состояний [диссертация]. М., 2003.
6. Щербак П. Л., Нижевич А. А., Логиновская В. В., Щербак М. Ю., Кудрявцева Л. В., Митрохин С. Д. и др. Микроэкология кишечника у детей и ее нарушения. *Фарматека*. 2007; (14): 28–34.
7. Акоев Ю. С. Функциональные особенности недоношенных детей в раннем онтогенезе [диссертация]. М., 1999.
8. Копанев Ю. А., Соколов А. Л. Дисбактериоз кишечника: микробиологические, иммунологические и клинические аспекты микроэкологических нарушений у детей. М., 2002.
9. Степурина О. В. Первичное инфицирование ребенка. Инфекционные заболевания детей и экология человека. Ставрополь, 1999; 92–7.
10. Фролова Н. А. Особенности формирования микробиоценоза у детей раннего возраста в зависимости от микробного пейзажа кишечника матери [диссертация]. Смоленск, 2001.
11. Никитенко В. И., Ткаченко Е. И., Стадников А. А. Транслокация бактерий из желудочно-кишечного тракта — естественный защитный механизм. *Эксперимент. и клин. гастроэнтерол*. 2004; (1): 48.
12. Funkhouser LJ, Bordenstein SR. Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. *PLoS Biol*. 2013; (11): e1001631.
13. Muglia LJ, Katz M. The enigma of spontaneous preterm birth. *N Engl J Med*. 2010; 362: 529–35.
14. Onderdonk AB, Hecht JL, McElrath TF, Delaney ML, Allred EN, Leviton A. Colonization of second-trimester placenta parenchyma. *Am J Obstet Gynecol*. 2008; 199: 51–2.
15. Соловьева И. В., Белова И. В., Точилина А. Г., Ефимов Е. И., Пожидаева А.С. Формирование микрофлоры толстой кишки у детей. *Микробиологический и эпидемиологический вестник Нижегородского университета им. Н. И. Лобачевского*. 2012; (2–3): 93–9.
16. Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta paediat*. 2003; 91 (441): 48–55.
17. Orrhagt K, Nord CE. Factors controlling the bacterial colonization of the intestine in breastfed infants. *Acta Paediatr*. 1999; 88 (430): 47–57.
18. Edwards CA, Parret AM. Intestinal flora during the first months of life: new perspectives. *Br J Nutr*. 2002; 88 (11): 11–8.
19. Goldman AS. Modulation of the gastrointestinal tract of infants by human milk. Interfaces and interactions. An evolutionary perspective. *J Nutr*. 2000; 130 (2): 426–31.
20. Нетребенко О. К. Питание грудного ребенка и кишечная микрофлора. *Педиатрия*. 2005; (3): 53–7.
21. Ткаченко Е. И., Суворова А. Н., редакторы. Дисбиоз кишечника. Руководство по диагностике и лечению. СПб. ИнформМед, 2009; 276 с.
22. Шабалов Н. П. Неонатология. М.: Медпресс-информ, 2004; с.128–29.
23. Нетребенко О. К. Питание и развитие иммунитета у детей на разных видах вскармливания. *Педиатрия. Журнал им. Г. Н. Сперанского*. 2005; (6): 50–6.
24. Печуров Д. В., Турти Т. В., Беляева И. А., Тяжева А. А. Микробиота кишечника у детей: от профилактики нарушений становления к предупреждению неинфекционных заболеваний. *Педиатрическая фармакология*. 2016; 13 (4): 377–83.
25. Суворов А. Н. Микробиота детей. *Природа*. 2011; (8): 14–21.

References

1. OST 91500.11.0004-2003. Protokol vedeniya bol'nykh. Disbakterioz kishhechnika. Utv. Prikazom MZ RF № 231 ot 09.06.2003. Moscow, 2003, 173 p.
2. Metodicheskiye rekomendatsii "Bakteriologicheskaya diagnostika disbakterioza kishhechnika" Minzdrav RSFSR. 1977.
3. Metodicheskiye rekomendatsii "Mikrobiologicheskaya diagnostika disbakterioza kishhechnika". Moskva, 2007.
4. Gronlund MM, Arvilommi H, Kero P, Lehtonen OP, Isolauri E. Importance of intestinal colonization in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0-6 months. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*. 2000; 83 (3): 186–92.
5. Levanova LA. Mikroekologiya kishhechnika zhitelej Zapadnoj Sibiri, korrekciya disbioticheskikh sostoyanij [dissertation]. M., 2003.
6. Shcherbakov PL, Nizhevich AA, Loginovskaya VV, Shcherbakova MYu, Kudriavtseva LV, Mitrokhin SD, et al. Mikroekologiya kishhechnika u detey i yeye narusheniya. *Farmateka*. 2007; (14): 28–34.
7. Akoyev YuS. Funktsional'nyye osobennosti nedonoshennykh detey v rannem ontogeneze [dissertation]. M., 1999.
8. Kopanев YuA, Sokolov AL. Disbakterioz kishhechnika: mikrobiologicheskiye, immunologicheskiye i klinicheskiye aspekty mikroekologicheskikh narusheniy u detey. M., 2002.
9. Stepurina OV. Pervichnoye infitsirovaniye rebenka. Infektsionnyye zabolevaniya detey i ekologiya cheloveka. Stavropol', 1999; 92–7.
10. Frolova NA. Osobennosti formirovaniya mikrobiotsenoza u detey rannego vozrasta v zavisimosti ot mikrobnogo peyzazha kishhechnika materi [dissertation]. Smolensk, 2001.
11. Nikitenko VI, Tkachenko EI, Stadnikov AA. Translokatsiya bakteriy iz zheludochno-kishhechnogo trakta — yestestvennyy zashchitnyy mekhanizm. *Eksp i klin gastroentorolog*. 2004; (1): 48.
12. Funkhouser LJ, Bordenstein SR. Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. *PLoS Biol*. 2013; (11): e1001631.
13. Muglia LJ, Katz M. The enigma of spontaneous preterm birth. *N Engl J Med*. 2010; 362: 529–35.
14. Onderdonk AB, Hecht JL, McElrath TF, Delaney ML, Allred EN, Leviton A. Colonization of second-trimester placenta parenchyma. *Am J Obstet Gynecol*. 2008; 199: 51–2.
15. Solov'yeva IV, Belova IV, Tochilina AG, Efimov EI, Pozhidaeva AS. Formirovaniye mikroflory tolstoy kishki u detey. *Mikrobiologicheskij i epidemiologicheskij vestnik Nizhegorodskogo universiteta imeni N. I. Lobachevskogo*. 2012; (2–3): 93–9.

16. Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta pediat.* 2003; 91 (441): 48–55.
17. Orrhagt K, Nord CE. Factors controlling the bacterial colonization of the intestine in breastfed infants. *Acta Paediatr.* 1999; 88 (430): 47–57.
18. Edwards CA, Parret AM. Intestinal flora during the first months of life: new perspectives. *Br J Nutr.* 2002; 88 (11): 11–8.
19. Goldman AS. Modulation of the gastrointestinal tract of infants by human milk. Interfaces and interactions. An evolutionary perspective. *J Nutr.* 2000; 130 (2): 426–31.
20. Netrobenko OK. Pitaniye grudnogo rebenka i kischechnaya mikroflora. *Pediatriya.* 2005; (3): 53–57.
21. Tkachenko EI, Suvorova AN, editors. *Disbioz kischechnika. Rukovodstvo po diagnostike i lecheniyu.* SPb. InformMed, 2009; 276 p.
22. Shabalov NP. *Neonatologiya.* Moscow: Medpress-inform, 2004; p. 128–9.
23. Netrobenko OK. Pitaniye i razvitiye immuniteta u detey na raznykh vidakh vskarmivaniya. *Pediatriya. Zhurnal imeni G. N. Speranskogo.* 2005; (6): 50–6.
24. Pechkurov DV, Turti TV, Belyaeva IA, Tjazheva AA. Intestinal microflora in children: from formation disturbances prophylaxis to preventing non-infectious diseases. *Pediatric pharmacology.* 2016; 13 (4): 377–83.
25. Suvorov AN. *Mikrobiota detey. Priroda.* 2011; (8): 14–21.