

УДК 616.345-093

Л.Г. Боронина^{1,2}, Г.В. Федотова¹, Е.В. Саматова², И.В. Вахлова¹
**ГАЗОЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ И ТРАДИЦИОННЫЕ
МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ У ДЕТЕЙ
ПЕРВОГО ГОДА ЖИЗНИ**

¹Уральский государственный медицинский университет, г. Екатеринбург, Российская Федерация;²Областная детская клиническая больница, г. Екатеринбург, Российская Федерация

L.G. Boronina^{1,2}, G.V. Fedotova¹, E.V. Samatova², I.V. Vakhlova¹
**GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY AND TRADITIONAL
METHODS OF STUDY OF INTESTINAL MICROBIOTES IN
CHILDREN OF FIRST YEAR OF LIFE**

¹Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation;²Regional Children's Clinical Hospital, Yekaterinburg, Russian Federation

Резюме. *Цель исследования* — оценить возможность использования и диагностическую значимость культурального исследования кала и метода газожидкостной хроматографии по обнаружению короткоцепочечных жирных кислот в фекалиях при изучении микробиоты кишечника у детей первого года жизни. *Материалы и методы.* Проведено параллельное культуральное исследование и определение короткоцепочечных жирных кислот методом газожидкостной хроматографии в кале у детей до года: условно-здоровых (n=121) и перенесших резекцию кишечника (n=47). *Результаты.* У условно-здоровых детей уровень уксусной кислоты, отражающий активность аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, ниже, чем у детей с резекцией кишечника. И наоборот уровень пропионовой и масляной кислот, показывающие активность анаэробов, выше. Анаэробный индекс у условно-здоровых детей несколько более смещен в отрицательные значения, что также свидетельствует о большей активности анаэробных микроорганизмов. Данное наблюдение подтверждается культурально. У детей, перенесших резекцию кишечника, по сравнению с условно-здоровыми, более высокие уровни факультативно-анаэробной условно-патогенной флоры, в частности группы *Enterobacteriaceae* (*E. coli* лактозонегативная и гемолитическая; *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp.) и группы *Morganellaceae* (*Proteus* spp.), а также *Staphylococcus aureus*, при меньшем содержании анаэробов. *Заключение.* Сочетание культурального исследования для исключения инфекционной патологии и изучение метаболической активности микроорганизмов, основанной на определении короткоцепочечных жирных кислот методом газожидкостного хроматографического анализа, позволит дать комплексное лабораторное заключение о состоянии микробиоты кишечника у детей до

Abstract. The *purpose* of the study was to assess the possibility of using and the diagnostic significance of stool culture and the gas-liquid chromatography method for detecting short-chain fatty acids in feces when studying the intestinal microbiota in children of the first year of life. *Materials and methods.* A parallel culture test and the determination of short-chain fatty acids by the gas-liquid chromatography method in feces in children under one year were made: conditionally healthy (n=121) and resected intestinal resection (n=47). *Results.* In conditionally healthy children, the level of acetic acid, reflecting the activity of aerobic and facultative anaerobic microorganisms, is lower than in children with intestinal resection. Conversely, the level of propionic and butyric acids, showing the activity of anaerobes, is higher. Anaerobic index in conditionally healthy children is shifted to more negative values, which also indicates a greater activity of anaerobic microorganisms. This observation is confirmed by culture. In children who underwent intestinal resection, in comparison with conditionally healthy, higher levels of facultative-anaerobic conditionally pathogenic flora, in particular the *Enterobacteriaceae* group (*E. coli* lactose-negative and hemolytic, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp.) and group *Morganellaceae* (*Proteus* spp.), as well as *Staphylococcus aureus*, with a lower content of anaerobes. *Conclusion.* The combination of culture research, to exclude infectious pathology, and the study of the metabolic activity of microorganisms based on the determination of short-chain fatty acids by gas-liquid chromatographic analysis will yield a comprehensive laboratory report on the state of the intestinal microbiota in children up to a year.

Keywords: intestinal microbiota, children, culture, short-chain fatty acids, intestinal

года.

Ключевые слова: кишечная микробиота, дети, культуральное исследование, короткоцепочечные жирные кислоты, резекция кишечника

Конфликт интересов отсутствует.

There is no conflict of interest.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Саматова Елена Валерьевна
lavrinenko@eka-net.ru

Contact information of the author responsible for correspondence:

Elena V. Samatova
lavrinenko@eka-net.ru

Дата поступления 09.10.2018

Received 09.10.2018

Образец цитирования:

Боронина Л.Г., Федотова Г.В., Саматова Е.В., Вахлова И.В. Газожидкостная хроматография и традиционные методы изучения кишечной микробиоты у детей первого года жизни. Вестник уральской медицинской академической науки. 2018, Том 15, №5, с. 733–743, DOI: 10.22138/2500-0918-2018-15-5-733-743

For citation:

Boronina L.G., Fedotova G.V., Samatova E.V., Vakhlova I.V. Gas-liquid chromatography and traditional methods of study of intestinal microbiotes in children of first year of life. Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science. 2018, Vol. 15, no. 5, pp. 733–743. DOI: 10.22138/2500-0918-2018-15-5-733-743 (In Russ)

Введение

В настоящее время важная роль при оценке влияния как на текущее, так и на будущее состояние здоровья человека, отводится микробиоте кишечника, с учетом особенностей ее формирования начиная с периода новорожденности [1]. Интерес изучения микробиома человека, в частности, кишечника, связан с развитием новых технологий и разработкой новых методов определения бактерий. По своей роли в поддержании гомеостаза кишечная микрофлора не уступает любому другому жизненно важному органу, а особенности состава микробиоты могут влиять на риск развития различных патологий и приводить к значительным отклонениям в здоровье человека [2, 3, 4, 5, 6, 7]. Микробиота человека представляет собой совокупность множества видов микроорганизмов. Индивидуальность и определенное постоянство микрофлоры каждого человека во многом определено генетически, в то же время микробиоценоз чутко реагирует на любые внешние воздействия [6]. Для формирования нормальной микробиоты кишечника ребенка необходимо правильное питание, здоровый образ жизни матери, хорошие условия проживания, физиологическое течение беременности у здоровой женщины, роды в срок через естественные родовые пути, раннее прикладывание (в течение первых 30 мин после рождения) к груди, получение ребенком молозива, исключительно грудное вскармливание в первое полугодие жизни, рациональное питание, начиная с раннего детского возраста. Также важно учитывать, применялись ли антибактериальные препараты во время беременности или в период ново-

рожденности [1, 8, 9, 10, 11]. В настоящее время считается доказанным факт внутриутробного «знакомства» с материнской микробиотой в результате трансплацентарной передачи микроорганизмов [1]. Наиболее выраженные изменения со стороны кишечной микрофлоры наблюдаются в течение первого года жизни ребенка. Среди применяемых методов диагностики состояния микробиоценоза кишечника в практических лабораториях клинической микробиологии лидирует рутинное бактериологическое (культуральное) исследование фекалий, также применяются полимеразно-цепная реакция, хромато-масс-спектрометрия и исследование метаболической активности кишечной микробиоты [5, 12, 13]. Для изучения метаболитов был разработан способ, основанный на исследовании короткоцепочечных жирных кислот методом газожидкостного хроматографического анализа, который обладает высокой чувствительностью и специфичностью, простотой воспроизведения, возможностью быстрого получения результатов [13, 14, 15, 16]. В настоящее время в изученной нами доступной литературе не встретилось данных по референтным (нормативным) значениям содержания короткоцепочечных жирных кислот в кале здоровых детей первого года жизни, как в целом, так и по отдельным возрастным группам, за исключением возраста от 8 до 12 месяцев [17].

Цель исследования — оценить возможность использования и диагностическую значимость культурального исследования кала и метода газожидкостной хроматографии по обнаружению короткоцепочечных

жирных кислот в фекалиях при изучении микробиоты кишечника у детей первого года жизни.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести количественное культуральное исследование фекалий у детей первого года жизни: условно-здоровых и перенесших резекцию кишечника.

2. Изучить качественное и количественное содержание короткоцепочечных жирных кислот в кале у детей первого года жизни: условно-здоровых и перенесших резекцию кишечника.

3. Провести сравнение микробиоты кишечника и содержание короткоцепочечных жирных кислот у условно-здоровых детей первого года жизни в зависимости от анамнестических данных: вида родоразрешения и характера вскармливания.

Материалы и методы

Обследовано две группы детей первого года жизни.

Первую составили 121 условно-здоровый ребенок. Критериями включения в исследование являлись возраст до 12 месяцев, I или II группа здоровья у ребенка, отсутствие жалоб со стороны желудочно-кишечного тракта, отсутствие антибактериальной терапии за 3 месяца до начала исследования.

Вторая группа включала 47 детей, перенесших резекцию кишечника, из них: 34 (72,3%) с резекцией тонкого кишечника (основная причина — врожденный порок желудочно-кишечного тракта) и 13 (27,7%) с резекцией толстого кишечника (основная причина — болезнь Гиршпрунга). Все дети были в возрасте до 12 месяцев жизни. Длительность нахождения детей в хирургическом стационаре составила: при резекции тонкого кишечника — $51,27 \pm 8,99$ дней, при резекции толстой кишки — $23,43 \pm 3,84$ дней. В 100% случаев после первого этапа оперативного лечения дети получали антибактериальную терапию (АБТ). В среднем каждый ребенок получал по $4,41 \pm 0,59$ (мин. 2; макс. 11) антибактериальных препарата. Средний курс АБТ составил $7,60 \pm 0,86$ (мин. 2; макс. 15) дней. В терапии использовали у 78,72% (n=37) детей — ампициллин, у 57,45% (n=27) — амикацин, у 40,43% (n=19) — гентамицин, у 31,91% (n=15) — ванкомицин. Среди антибактериальных препаратов использовались также амоксилав, меропенем, цефурус, цефотаксим, метронидазол. Параллельно с антибактериальной терапией дети получали флюконазол. Выбор и длительность АБТ зависела от клинико-лабораторных показателей, смена препаратов осуществлялась после консультации клинического фармаколога.

Работа с медицинской документацией, пациентами и их законными представителями, забор биологического материала для исследования обсуждены и одобрены этическим комитетом организации, где проводилось исследование (ГБУЗ СО «ОДКБ №1» г. Ека-

теринбург, ул. Серафимы Дерябиной, д. 32, протокол №42 от 13.09.16 г.).

У детей обеих групп образцы фекалий исследовали параллельно: количественно — культуральным методом и методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) на обнаружение короткоцепочечных жирных кислот (КЖК). Доставку фекалий в лабораторию клинической микробиологии проводили согласно МУ 4.2.2039-05 [18].

Количественный посев фекалий производился из соответствующих десятикратных разведениях, согласно схеме, составленной на основании нормативной документации [13, 19, 20, 21]. Применялись следующие среды: для культивирования бактерии порядка Enterobacteriales, в том числе, патогенных — Плоскирева, Эндо, магниевая среда с последующим высевом на висмут-сульфит агар; кровяной агар — для выделения кокковой и гемолитической флоры; желточно-солевой агар — стафилококков; Сабуро — дрожжеподобных грибов; мясопептонный агар — протей; Бликфельда — лактобактерий; Блаурокка — бифидобактерий; среда Вильсон-Блер — клостридий. Для выявления других анаэробов (бактероидов, эубактерий, фузобактерий, пептострептококков) посев фекалий осуществлялся на прорегенерированную тиогликолевую среду, а для культивирования и идентификации чистой культуры использовались газпакеты GENbag anaer и плашки rapid ID 32A (bioMerieux, Франция).

Газожидкостный хроматографический анализ проводили по методике, предложенной М.Д. Ардатской с соавт. [14]. Способ определения КЖК (С2-С6 с изомерами) в биосубстратах складывался из двух этапов: процесса пробоподготовки и непосредственно анализа на газовом хроматографе модели 6890 фирмы Hewlett Packard (США) с пламенно-ионизационным детектором, с использованием кварцевой капиллярной колонки длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм, с неподвижной фазой типа FFAP (сополимер полиэтиленгликоля с тринитротерефталевой кислотой) толщиной 0,25 мкм. Режим хроматографического анализа — изотермический с температурой термостата 145°C, испарителя 230°C, детектора 250°C. Газ-носитель — азот. Содержание отдельных кислот (Ксп, мг/г образца) определялось автоматически в результате обработки полученных хроматограмм с помощью программы «Хромос» (ЗАО «Химаналитсервис», Россия).

В пробах определяли следующие продукты микробного метаболизма (маркеры): С2 — уксусная кислота; С3 — пропионовая кислота; iC4 — изомаляновая кислота; С4 — масляная кислота; iC5 — изовалериановая кислота; С5 — валериановая кислота; iC6 — изокапроновая кислота; С6 — капроновая кислота.

Качество используемого хроматографического способа разделения смеси жирных кислот фракции

C2-C6 оценивали с помощью аналитического стандарта — 46975-U SUPELCO Volatile Free Acid Mix (Sigma-Aldrich, США).

Относительные содержания уксусной, пропиононовой и масляной кислот (O_{C_2-4} , ед.) и анаэробный индекс (АИ, ед.) рассчитывали по следующим формулам (1-4) [22]: $O_{C_2} = K_{C_2} / (K_{C_2} + K_{C_3} + K_{C_4})$ (1); $O_{C_3} = K_{C_3} / (K_{C_2} + K_{C_3} + K_{C_4})$ (2); $O_{C_4} = K_{C_4} / (K_{C_2} + K_{C_3} + K_{C_4})$ (3);

АИ = $(O_{C_3} + O_{C_4}) / O_{C_2}$ (4), где K_{C_2} — концентрация уксусной кислоты (C_2), мг/г; K_{C_3} — концентрация пропиононовой кислоты (C_3), мг/г; K_{C_4} — концентрация масляной кислоты (C_4), мг/г.

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с использованием программ Microsoft Excel XP, Statistica 6.

Результаты и обсуждение

Оценивали качественное и количественное содержание короткоцепочечных жирных кислот в кале у условно-здоровых детей первого года жизни и перенесших резекцию кишечника (табл. 1).

Таблица 1
Количественное содержание короткоцепочеч-

ных жирных кислот в кале у детей первого года жизни: условно-здоровых и перенесших резекцию кишечника ($M \pm m$)

Table 1

Quantitative content of short-chain fatty acids in feces in children of the first year of life: conditionally healthy and having resected intestine ($M \pm m$)

Группа / Group	Суммарное содержание кислот, мг/г / Total acid content, mg/g	Уксусная кислота, мг/г / Acetic acid, mg/g	Пропиононовая кислота, мг/г / Propionic acid, mg/g	Масляная кислота, мг/г / Butyric acid, mg/g	Анаэробный индекс, ед. / Anaerobic index, units
Условно-здоровые дети / Conditionally healthy children (n=121)	6,908±0,67	0,794±0,017	0,126±0,013	0,079±0,012	-0,319±0,036
Дети, перенесшие резекцию кишечника / Children who underwent intestinal resection (n=47)	6,686±1,549	0,851±0,023	0,089±0,016	0,061±0,014	-0,190±0,031
p	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Условно-здоровые дети, родившиеся путем / Conditionally healthy children born by					
кеесарева сечения / cesarean section (n=45)	8,19±1,38	0,82±0,03	0,11±0,02	0,08±0,02	-0,29±0,06
естественным путем / natural childbirth (n=76)	4,83±0,54	0,77±0,03	0,15±0,02	0,08±0,02	-0,35±0,05
p	≤0,01	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Условно-здоровые дети, находящиеся / Conditionally healthy children who are on					
на грудном вскармливании / breast milk (n=82)	5,07±0,93	0,84±0,03	0,12±0,02	0,04±0,008	-0,22±0,04
на искусственном вскармливании / non-breastfed (n=39)	7,46±0,97	0,77±0,02	0,13±0,02	0,103±0,021	-0,39±0,06
p	>0,05	>0,05	>0,05	≤0,02	≤0,04

Уксусная, пропиононовая и масляная кислоты составляют основу всего пула КЖК, вырабатываемых микробиотой кишечника. У условно-здоровых детей уровень уксусной кислоты, отражающий активность аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, ниже, чем у детей с резекцией кишечника. И наоборот уровень пропиононовой и масляной кислот, показывающие активность анаэробов, выше, также как и анаэробный индекс, который у условно-здоровых детей смещен в более отрицательные значения, что свидетельствует о большей активности анаэробных микроорганизмов. Данный факт подтверждается и результатами культурального исследования фекалий у условно-здоровых детей и перенесших резекцию кишечника в целом до года (рисунок 1).

Оценка качественного и количественного состава (в колонеобразующих единицах на грамм, КОЕ/г) основной микрофлоры толстого кишечника обследованных пациентов, при культуральном (бактериологическом, микробиологическом) исследовании фекалий, проводилась согласно отраслевому стандарту «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» [20]. Определялись следующие микроорганизмы: 1) факультативно-анаэробные патогенные бактерии группы *Enterobacteriaceae* (*Shigella* spp., *Salmonella* spp., патогенные *Escherichia coli*); 2) аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы: условно-патогенные бактерии порядка *Enterobacteriales* (*E. coli* (типичная, лактозонегативная, гемолитическая), *Klebsiella* spp., *Enterobacter*

spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp. и др.); *Enterococcus* spp.; *Staphylococcus aureus*; коагулазоотрицательные стафилококки (КОС, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* и др.); неферментирующие грамотрицательные бактерии (НФГОБ,

Pseudomonas spp., *Acinetobacter* spp. и др.); *Candida* spp.; *Lactobacillus* spp.; 3) анаэробы: *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Fusobacterium* spp., *Eubacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Clostridium* spp.

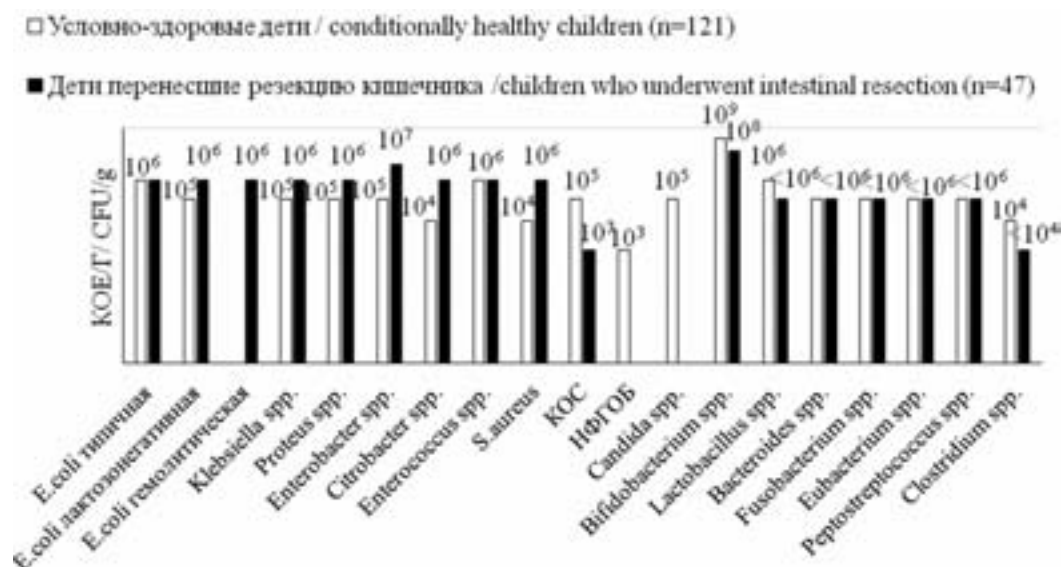


Рисунок 1. Сравнение микробиоты кишечника у условно-здоровых детей первого года жизни и у детей перенесших резекцию кишечника

Figure 1. Comparison of the intestinal microbiota in conditionally healthy children of the first year of life and in children who underwent intestinal resection

Примечание: КОС — коагулазоотрицательные стафилококки, НФГОБ — неферментирующие грамотрицательные бактерии

Note: CNS — coagulase-negative staphylococci, NFGOB - non-fermenting gram-negative bacteria

Патогенные бактерии группы Enterobacteriaceae (*Shigella* spp., *Salmonella* spp., патогенные *E. coli*) в обеих группах детей не обнаружены. У детей, перенесших резекцию кишечника, по сравнению с условно-здоровыми, отмечались более высокие уровни факультативно-анаэробной условно-патогенной флоры, в частности группы Enterobacteriaceae (*E. coli* лактозонегативная и гемолитическая; *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp.) и группы Morganellaceae (*Proteus* spp.), а также *S. aureus*. При этом бифидо- и лактобактерий, и анаэробных микроорганизмов (в первую очередь, *Clostridium* spp.) было меньше, что свидетельствует о дисбиозе кишечника, вероятно, обусловленном проводимой антибактериальной терапией, более поздним введением прикормов и другими причинами. По литературным данным отмечено, что избыточный рост таких видов условно-патогенной флоры как стафилококки, грибы рода *Candida* наблюдается у половины здоровых детей до 6 месяцев [1].

На основании обследованных нами 121 условно-здорового ребенка первого года жизни получены следующие референтные (нормативные) значения содержания короткоцепочечных жирных кислот ($M \pm m$) в

кале: уксусная кислота (C2) — $0,794 \pm 0,017$ мг/г; пропионовая кислота (C3) — $0,126 \pm 0,013$ мг/г; масляная кислота (C4) — $0,079 \pm 0,012$ мг/г; суммарное содержание кислот ($\Sigma C2+...C6$) — $6,908 \pm 0,67$ мг/г; анаэробный индекс (АИ) = $-0,319 \pm 0,036$ ед.

Другой задачей исследования являлось сравнение микробиоты кишечника и содержание КЖК у условно-здоровых детей первого года жизни в зависимости от анамнестических данных: вида родоразрешения и характера вскармливания. Результаты представлены в таблице 1 и на рисунках 2, 3.

Путем кесарева сечения было рождено 37,2%: Анализ вскармливания выявил, что грудное молоко получало 67,7% условно-здоровых детей ($n=82$), а искусственные смеси — 32,3% ($n=39$).

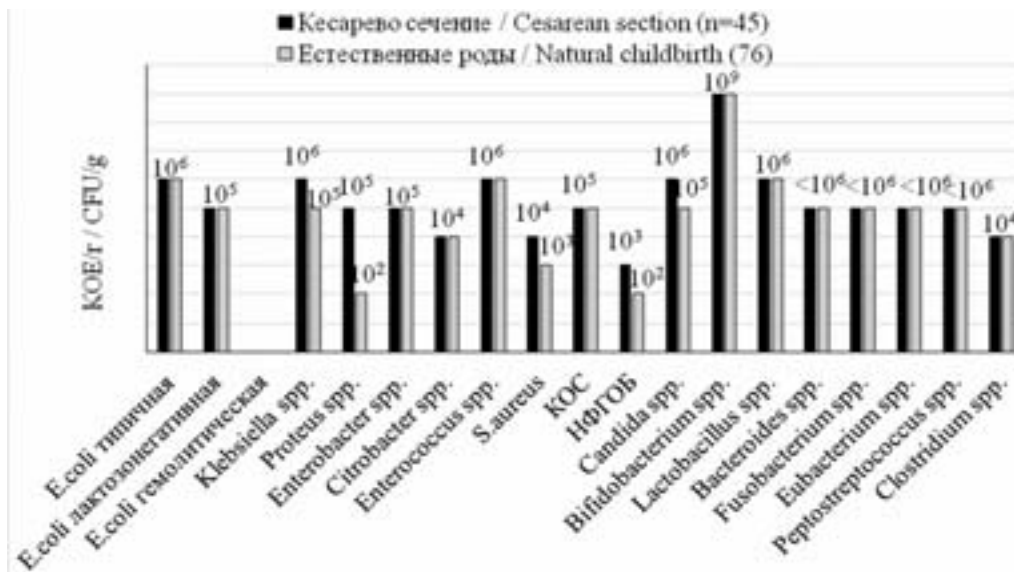


Рисунок 2. Сравнение микробиоты кишечника у условно-здоровых детей первого года жизни, в зависимости от пути родоразрешения

Figure 2. Comparison of the intestinal microbiota in conditionally healthy children of the first year of life, depending on the route of delivery

Примечание: КОС — коагулазоотрицательные стафилококки, НФГОБ — неферментирующие грамотрицательные бактерии

Note: CNS — coagulase-negative staphylococci, NFGOB - non-fermenting gram-negative bacteria

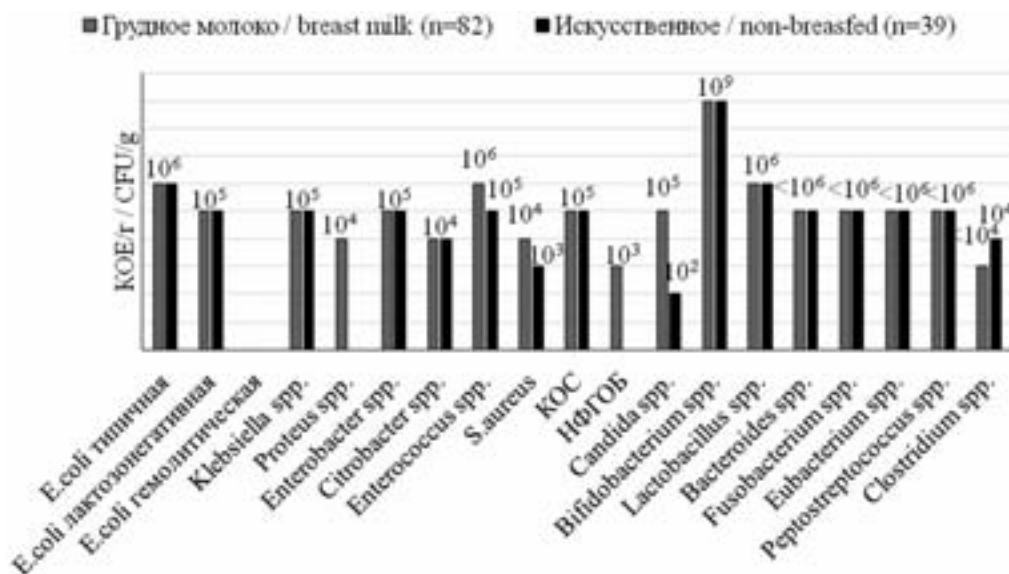


Рисунок 3. Сравнение микробиоты кишечника у условно-здоровых детей первого года жизни, в зависимости от характера вскармливания

Figure 3. Comparison of intestinal microbiota in conditionally healthy children of the first year of life, depending on the nature of feeding

Примечание: КОС — коагулазоотрицательные стафилококки, НФГОБ — неферментирующие грамотрицательные бактерии

Note: CNS — coagulase-negative staphylococci, NFGOB - non-fermenting gram-negative bacteria

У условно-здоровых детей первого года жизни, родившихся путем кесарева сечения, суммарное содержание кислот в кале достоверно выше, чем у детей при естественном родоразрешении. Культурально это подтверждается более высоким содержанием в кале условно-патогенной флоры: *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *S. aureus*, *Candida spp.*, НФГОБ. При родоразре-

шении естественным путем колонизация кишечника младенца происходит микроорганизмами, обитающими на родовых путях и коже матери. В последующем это способствует формированию защиты от инфекций за счет колонизационной резистентности — совокупности защитных факторов организма и конкурентных, антагонистических и других свойств нормальной ми-

крофлоры кишечника, придающих стабильность микробиоте и предотвращающих колонизацию слизистых оболочек посторонними микроорганизмами. А если ребенок родился при помощи кесарева сечения, то колонизация кишечника в первую очередь будет происходить флорой, обитающей в роддомах.

У условно-здоровых детей, находившихся на искусственном питании, уровни масляной кислоты и анаэробный индекс в кале достоверно выше, чем у детей на грудном вскармливании. Считается, что у детей, находящихся на искусственном вскармливании, с большей частотой выселяются условно-патогенные микроорганизмы, в том числе клостридии [1]. По результатам нашего исследования, у таких детей *Clostridium* spp. выделялись в концентрации 104 КОЕ/г, что на порядок выше, чем у детей получавших грудное молоко. Это свидетельствует о более раннем становлении микробиоценоза, как у «взрослого». Одинаковый уровень бифидо- и лактобактерий указывает о приближенности по составу современных смесей к грудному молоку.

Также проведен анализ концентрации основных КЖК в кале условно-здоровых детей не только в целом до года, но и по возрастным категориям: 0-1 месяц (n=30), 1-3 месяца (n=34), 3-6 месяцев (n=20), 6-12 месяцев (n=37). Результат приведен в таблице 2.

Суммарное содержание кислот в кале в целом составило 6,908±0,67 мг/г, при этом наибольшее значение у новорожденных — 10,379±1,86 мг/г, наименьшее — у детей 3-6 месяцев — 2,285±0,046 мг/г (p<0,001). Корреляционный анализ подтвердил снижение суммарного содержания КЖК в кале с возрастом, к году жизни (r= -0,365; p<0,005).

Уровень уксусной кислоты как маркера аэробной и факультативно-анаэробной микрофлоры у условно-здоровых детей до года составил 0,794±0,017 мг/г. Максимальное значение отмечалось у детей до 1 месяца — 0,839±0,034 мг/г, а затем прослеживалась тенденция к уменьшению уровня уксусной кислоты в кале с возрастом ребенка. За исключением 3-6 месяцев, где небольшой подъем, вероятно, обусловлен изменением метаболической активности микроорганизмов в ответ на введение прикормов у детей, находящихся на искусственном вскармливании. Отмечены достоверные различия в содержании уксусной кислоты в кале между детьми 0-1 и 6-12 месяцев (p<0,01).

Пропионовая и масляная кислоты, являющиеся маркерами анаэробных процессов в кишечнике, у всех детей составили 0,126±0,013 и 0,079±0,012 мг/г соответственно. Наибольший уровень пропионовой кислоты отмечен у детей в возрасте 6-12 месяцев, наименьшие значения — в группе 3-6 месяцев. Достоверных различий в содержании пропионовой кислоты в зависимости от возраста выявлено не было, но найдена положительная связь между её уровнем и возра-

стом (r=0,27; p<0,05), означающая нарастание содержания пропионовой кислоты в кале к году жизни ребенка. Минимальное значение масляной кислоты в кале составило у новорожденных — 0,046±0,023 мг/г, а максимальное у детей 6-12 месяцев — 0,114±0,019 мг/г (p<0,02). Таким образом, также выявлена тенденция к увеличению уровня масляной кислоты в кале с возрастом ребенка.

Таблица 2
Содержание короткоцепочечных жирных кислот в кале у условно-здоровых детей в зависимости от возраста, M±m

Table 2
The content of short-chain fatty acids in stool in conditionally healthy children, depending on age, M±m

0-1 месяцев / 0-1 months, (n=30)	1-3 месяцев / 1-3 months, (n=34)	3-6 месяцев / 3-6 months, (n=20)	6-12 месяцев / 6-12 months, (n=37)	p
1	2	3	4	
Суммарное содержание кислот, мг/г / Total acid content, mg/g				
10,379±1,86	5,571±0,813	2,285±0,046	7,822±1,168	p _{1,2} <0,01 p _{2,3} <0,00 p _{3,4} <0,00 p _{1,3} <0,001
Уксусная кислота, мг/г / Acetic acid, mg/g				
0,839±0,034	0,789±0,044	0,823±0,028	0,722±0,021	p _{3,4} <0,03 p _{1,4} <0,01
Пропионовая кислота, мг/г / Propionic acid, mg/g				
0,115±0,029	0,135±0,034	0,100±0,019	0,139±0,015	p>0,05
Масляная кислота, мг/г / Butyric acid, mg/g				
0,046±0,023	0,075±0,031	0,076±0,018	0,114±0,019	p _{1,4} <0,02
Анаэробный индекс, ед. / Anaerobic index, units				
-0,297±0,094	-0,308±0,075	-0,244±0,046	-0,389±0,052	p>0,05

Анаэробный индекс у всех детей составил — 0,319±0,036 мг/г. Достоверных различий между возрастными группами в значениях анаэробного индекса не выявлено.

Отмеченные тенденции уменьшения содержания уксусной и увеличения пропионовой, масляной кислот и анаэробного индекса в кале условно-здоровых детей от периода новорожденности к концу первого года свидетельствуют о «стабилизации» становления микробиоты кишечника ребенка к году жизни (динамического аэробно-анаэробного баланса). Данное наблюдение подтверждается и результатами культурального исследования фекалий. У новорожденных количество условно-патогенных бактерий, относящихся к факультативно-анаэробным микроорганизмам, таких как: *Klebsiella* spp. (10⁶ КОЕ/г), *Enterobacter* spp. (10⁶ КОЕ/г) и грибы рода *Candida* (10⁶ КОЕ/г), на один или два порядка выше, чем у детей 6-12 месяцев. Это, вероятно, обусловлено колонизацией кишечника новорожденных флорой, обитающей в роддомах. И, наоборот, у детей 6-12 месяцев анаэробные микроор-

ганизмы рода *Clostridium* обнаружены в концентрации 10^4 КОЕ/г, а у новорожденных $<10^4$ КОЕ/г. Выявленная тенденция в уровнях метаболитов кишечной микробиоты у условно-здоровых детей первого года жизни является отражением комплексного воздействия факторов внешней и внутренней среды организма ребенка.

Содержание КЖК в кале у детей, перенесших резекцию кишечника, как в зависимости от возраста, так и от уровня резекции не показало достоверных различий, что, вероятно, связано с необходимостью увеличения группы исследования и будет опубликовано позднее. Особых различий в результатах культурального исследования также выявлено не было.

Бактериологическое исследование фекалий наиболее широко применяется в практических лабораториях клинической микробиологии для определения дисбиотических изменений кишечника. Основным достоинством метода является точная идентификация патогенных бактерий группы *Enterobacteriaceae*. С другой стороны его диагностические возможности ограничены. К основным недостаткам можно отнести: длительность получения результатов (5-7-10 дней); зависимость от соблюдения сроков транспортировки и качества приготовленных сред; преимущественное определение внутрипросветной и транзитной флоры; неоднородность выделения микроорганизмов из разных отделов испражнений; длительность и дороговизна стоимости культивирования анаэробов [13]. Результатом культурального исследования фекалий является только численность выделенных микроорганизмов, при этом не учитывается их метаболическая активность, что важно для оценки функционального состояния кишечника. При концентрациях микроорганизмов в пределах возрастной нормы и выше, которая определяется согласно отраслевому стандарту [20], их активность может быть снижена, а следовательно, представители нормальной микрофлоры не осуществляют свои положительные функции (колониционную резистентность, детоксикационную, синтетическую, пищеварительную и др. [1, 6, 12, 13, 15]. Сравнение культурального метода и ГЖХ представлено в таблице 3.

Исследование метаболической активности кишечной микробиоты, основанной на определении КЖК методом газожидкостного хроматографического анализа, позволяет быстро и точно оценить состояние микробиоценоза кишечника по сравнению с бактериологическим методом, и в первую очередь обеспечить высокую точность в оценке основных анаэробных популяций микроорганизмов. Но его нельзя использовать для выявления патогенных бактерий порядка *Enterobacterales*. Поэтому только сочетание культурального исследования, для исключения инфекционной патологии, и ГЖХ позволит дать комплексное ла-

бораторное заключение о состоянии микробиоты кишечника у детей до года.

Таблица 3
Сравнение культурального метода и газожидкостной хроматографии
Table 3
Comparison of the culture method and gas liquid chromatography

Определение микроорганизмов согласно ОСТ 91500.11.0004-2003 «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» / Determination of microorganisms according to OST 91500.11.0004-2003 "Protocol of management of patients. Dysbacteriosis of the intestine»	Культуральный метод / Culture method	Газожидкостная хроматография / Gas liquid chromatography
Патогенные бактерии группы <i>Enterobacteriaceae</i> / Pathogenic bacteria of the group <i>Enterobacteriaceae</i>	+	-
Видовая идентификация / Species identification	+	-
Аэробные и факультативно-анаэробные бактерии / Aerobic and facultative anaerobic bacteria	+	+
<i>Candida</i> spp. / <i>Candida</i> spp.	+	+
Анаэробные микроорганизмы / Anaerobic microorganisms	-/+	+

Примечание: + обнаруживаются; – не обнаруживаются; –/+ переменный признак

Note: + are detected; – do not show up; –/+ variable sign

Выводы

1. Показано, что у условно-здоровых детей первого года жизни, родившихся путем кесарева сечения, суммарное содержание кислот в кале достоверно выше, чем у детей, родившихся при естественном родоразрешении, что подтверждается более высоким содержанием в кале условно-патогенной флоры: *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *S. aureus*, *Candida* spp., неферментирующих грамотрицательных бактерий, выявленных культуральным методом.

2. Выявлено, что у условно-здоровых детей, находившихся на искусственном вскармливании, уровни масляной кислоты, анаэробного индекса, а также выделение в кале *Clostridium* spp. в концентрации 10^4 КОЕ/г, существенно выше, чем у детей, получавших грудное молоко, что в целом свидетельствует о преобладании анаэробных микроорганизмов в кишечнике у детей, получающих искусственные молочные смеси.

3. У детей, перенесших резекцию кишечника, обнаруживаются более высокие уровни факультативно-анаэробной условно-патогенной флоры, более низкие уровни бифидо- и лактобактерий, анаэробных микроорганизмов, а также более низкие уровни пропионовой и масляной кислот, анаэробного индекса, свиде-

тельствующих о сниженной активности анаэробных микроорганизмов. Данные результаты можно объяснить влиянием на микробиоту кишечника антибактериальной терапии, проводимой всем детям с резекцией кишки.

4. При оценке состояния микробиоты кишечника у детей первого года жизни оптимальным является сочетание культурального метода исследования (с целью исключения инфекционной патологии) и изучения метаболической активности микроорганизмов, основанного на определении короткоцепочечных жирных кислот методом газожидкостного хроматографического анализа. Это позволит дать комплексное лабораторное заключение о состоянии микробио-

ты кишечника у детей до года и способствовать правильной клинической оценке состояния здоровья ребенка.

Заключение

Выявленные тенденции изменения метаболитов кишечной микробиоты у условно-здоровых детей первого года жизни являются отражением комплексного воздействия факторов внешней и внутренней среды организма ребенка и требуют дальнейшего изучения с целью выявления предикторов нарушения становления кишечной микробиоты, разработки методов его профилактики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Печкуров Д.В., Турты 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): 377-383.

2. Kelly D., Mulder E. Microbiome and immunological interaction. Nutrition Rev. 2012 Aug; 70 (Suppl.1): 518-530. PMID: 22861803 DOI: 10.1111/j1753-4887.2012.00498.x

3. Sudo N., Sawamura S., Tanaka K., Aiba Y., Kubo C., Koqa Y. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. J. Immunol. 1997 Aug; 159: 1739-1745. PMID: 9257835

4. Cani P.D., Neyrinck A.M., Fava F., Knauf C., Burcelin R.G., Tuohy K.M., et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxemia. Diabetologia. 2007 Nov; 50(11): 2374-2383. PMID: 17823788 DOI: 10.1007/s00125-007-0791-0

5. Алешкин В.А., Селькова Е.П., Затевалов А.М., Миронов А.Ю., Волчецкий А.Л., Гудова Н.В. Определение дисбиотических изменений желудочно-кишечного тракта по маркерам содержимого кишечника. Федеральные клинические рекомендации. Н. Новгород: Изд-во «Ремедиум Приволжье», 2016.

6. Макарова С.Г., Намазова-Баранова Л.С. Кишечная микробиота и использование пробиотиков в практике педиатра. Что нового? Педиатрическая фармакология. 2015; 12(1): 38-45.

7. Hood L., Heath J.R., Phelps M.E., Lin B. Systems biology and new technologies enable predictive and preventative medicine. Science. 2004 Oct; 306(5696): 640-643. PMID: 15499008 DOI: 10.1126/science.1104635

8. Захарова И.Н., Дмитриева Ю.А. Кишечная микробиота и применение пробиотиков с позиции доказа-

REFERENCES

1. Pechkurov D.V., Turty T.V., Belyaeva I.A., Tyazheva A.A. Microbiota of the intestine of children: from the prevention of disorders of becoming to the prevention of non-infectious diseases. Pediatric Pharmacology = Pediatricheskaja farmakologija. 2016. no. 13 (4), pp. 377-383, (In Russ).

2. Kelly D., Mulder E. Microbiome and immunological interaction. Nutrition Rev. 2012 Aug. Vol. 70 (Suppl.1). pp. 518-530. PMID: 22861803 DOI: 10.1111/j1753-4887.2012.00498.x.

3. Sudo N., Sawamura S., Tanaka K., Aiba Y., Kubo C., Koqa Y. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. J. Immunol. 1997 Aug. Vol. 159. pp. 1739-1745. PMID: 9257835.

4. Cani P.D., Neyrinck A.M., Fava F., Knauf C., Burcelin R.G., Tuohy K.M., et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxemia. Diabetologia. 2007 Nov. Vol. 50 (11). pp. 2374-2383. PMID: 17823788 DOI: 10.1007/s00125-007-0791-0.

5. Aleshkin V.A., Selkova E.P., Zatevalov A.M., Mironov A.Yu., Volchetsky A.L., Gudova N.V. Determination of dysbiotic changes in the gastrointestinal tract by markers of intestinal contents. Federal clinical guidelines. N. Novgorod, Publishing house «Remedium Privolzhye», 2016. (In Russ).

6. Makarova S.G., Namazova-Baranova L.S. Intestinal microbiota and use of probiotics in pediatric practice. What's wrong? Pediatric Pharmacology = Pediatricheskaja farmakologija. 2015. no. 12 (1), pp. 38-45, (In Russ).

7. Hood L., Heath J.R., Phelps M.E., Lin B. Systems biology and new technologies enable predictive and preventative medicine. Science. 2004 Oct. Vol. 306 (5696). pp. 640-643. PMID: 15499008 DOI: 10.1126/science.1104635.

8. Zakharova I.N., Dmitrieva Yu.A. Intestinal microbiota and application of probiotics from the position of evidence-based medicine. Consilium Medicum. Pediatrics (adj.) = Consilium Medicum. Pediatrja (Pril.). 2016. no. 4, pp. 24-

- тельной медицины. Consilium Medicum. Педиатрия (Прил.). 2016; 4: 24–28.
9. Azad M.B., Konya T., Maughan H., Guttman D.S., Field C.J., Chari R.S., et al. Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months. *Can. Med. Ass. Journal*. 2013; 51 (3): 385-394. PMID: 23401405
10. Klessen B., Bunke H., Tovar K., Sawatzki G. Influence of two infant formulas and human milk on the development of the fecal flora in newborn infants. *Acta Paediatrica*. 1996 Jan; 84(12): 1347-1356. DOI: 10.1111/j.1651-2227.1995.tb13567.x
11. Родригес Х.М. Микробиота женского молока. Consilium Medicum. Педиатрия (Прил.). 2016; 4: 35–40.
12. Минушкин О.Н., Ардатская М.Д. Диагностика состояния микрофлоры кишечника и дифференцированная коррекция ее нарушений. Пособие для врачей. Москва; 2005.
13. Ардатская М.Д., Бельмер С.В., Добрица В.П., Захаренко С.М., Лазебник Л.Б., Минушкин О.Н., и др. Дисбиоз (дисбактериоз) кишечника: современное состояние проблемы, комплексная диагностика и лечебная коррекция. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. Выпуск 117. 2015; 5: 13-50.
14. Пат. 2220755 Российская Федерация «Способ разделения смеси жирных кислот фракции C2-C6 методом газожидкостной хроматографии». М.Д. Ардатская, Н.С. Иконников, О.Н. Минушкин; заявитель и патентообладатель Учебно-Научный центр Медицинского центра Управления делами Президента РФ. № 2002119447; заявл. 23.07.02; опубл. 10.01.04.
15. Ардатская М.Д. Клиническое значение короткоцепочечных жирных кислот при патологии желудочно-кишечного тракта. Автореферат дис. докт. мед. наук. Москва; 2003.
16. Сугян Н.Г. Клиническое значение короткоцепочечных жирных кислот при функциональных нарушениях желудочно-кишечного тракта у детей раннего возраста. Автореф. дис. кан. мед. наук. Москва; 2010.
17. Носкова О.Ю., Григорович М.С., Ардатская М.Д. Функциональная активность микробиоты кишечника у детей раннего возраста в зависимости от свойств кисломолочного прикорма. Медицинский альманах. 2015; 2(37): 102-106.
18. Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории. Методические указания 4.2.2039-05. Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России. Москва; 2005.
19. Бактериологическая диагностика дисбактериоза кишечника. Методические рекомендации Министерства здравоохранения РСФСР. Москва; 1977.
20. Об утверждении отраслевого стандарта 91500.11.0004-2003 «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника». Приказ Министерства здравоохранения, (In Russ).
9. Azad M.B., Konya T., Maughan H., Guttman D.S., Field C.J., Chari R.S., et al. Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months. *Can. Med. Ass. Journal*. 2013. Vol. 51 (3). pp. 385-394. PMID: 23401405.
10. Klessen B., Bunke H., Tovar K., Sawatzki G. Influence of two infant formulas and human milk on the development of the fecal flora in newborn infants. *Acta Paediatrica*. 1996 Jan. Vol. 84 (12). pp. 1347-1356. DOI: 10.1111/j.1651-2227.1995.tb13567.x.
11. Rodrigues H.M. Microbiota of human milk. Consilium Medicum. Pediatrics (adj.) = Consilium Medicum. *Pediatrjia* (Pril.). 2016. no. 4, pp. 35-40, (In Russ).
12. Minushkin O.N., Ardatskaya M.D. Diagnosis of the state of the intestinal microflora and differentiated correction of its disorders. A manual for doctors. Moscow, 2005, (In Russ).
13. Ardatskaya M.D., Belmer S.V., Dobritsa V.P., Zakharenko S.M., Lazebnik L.B., Minushkin O.N., et al. Disbiosis (dysbacteriosis) of the intestine: current state of the problem, complex diagnosis and treatment correction. *Experimental and clinical gastroenterology = Jeksperimental'naja i klinicheskaja gastrojenterologija*. Issue 117. 2015, no. 5, pp. 13-50, (In Russ).
14. Pat. 2220755 Russian Federation «A method for separating a fatty acid mixture of the C2-C6 fraction by gas-liquid chromatography». M.D. Ardatskaya, N.S. Ikonnikov, O.N. Minushkin; applicant and patent holder Educational-Scientific Center of the Medical Center of the Administration of the President of the Russian Federation. No. 2002119447; claimed. 23.07.02; publ. 10.01.04, (In Russ).
15. Ardatskaya M.D. Clinical significance of short-chain fatty acids in pathology of the gastrointestinal tract. Abstract of the dis. Doct. honey. sciences. Moscow, 2003, (In Russ).
16. Sugyan N.G. Clinical significance of short-chain fatty acids in functional disorders of the gastrointestinal tract in young children. Author's abstract. dis. Can. honey. sciences. Moscow, 2010, (In Russ).
17. Noskova O.Yu., Grigorovich M.S., Ardatskaya M.D. Functional activity of intestinal microbiota in children of early age, depending on the properties of sour-milk complementary foods. *Medical almanac = Medicinskij al'manah*. 2015. no. 2 (37), pp. 102-106, (In Russ).
18. Techniques for collecting and transporting biomaterials in microbiological laboratories. Methodical instructions 4.2.2039-05. The Federal Center for Sanitary and Epidemiological Supervision of the Russian Ministry of Health. Moscow, 2005, (In Russ).
19. Bacteriological diagnosis of intestinal dysbacteriosis. Methodical recommendations of the Ministry of Health of the RSFSR. Moscow, 1977, (In Russ).
20. On the approval of the industry standard 91500.11.0004-2003 «Protocol of management of patients.

охранения Рос. Федерации от 09.06.2003 №231. Москва; 2003.

21. Биргер М.О., ред. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. М.: Медицина; 1973.

22. Минушкин О.Н., Ардатская М.Д., Иконников Н.С. Способ определения короткоцепочечных жирных кислот (фракции С2-С6 с изомерами) в различных биологических субстратах методом газожидкостной хроматографии: метод. рекомендации для врачей, руководителей органов управления здравоохранением и ЛПУ. Российская медицинская академия последипломного образования. Москва; 2005.

Disbacteriosis of intestinals». Order of the Ministry of Health Ros. Federation of 09.06.2003 №231. Moscow, 2003, (In Russ).

21. Birger M.O., ed. Handbook of microbiological and virological methods of research. Moscow, Medicine, 1973, (In Russ).

22. Minushkin O.N., Ardatskaya M.D., Ikonnikov N.S. Method for the determination of short-chain fatty acids (C2-C6 fractions with isomers) in various biological substrates by the gas-liquid chromatography method. recommendations for doctors, heads of health authorities and health facilities. Russian Medical Academy

Авторы

Боронина Любовь Григорьевна
Уральский государственный медицинский университет
Д.м.н., профессор кафедры клинической лабораторной диагностики и бактериологии
Российская Федерация, 620028 г. Екатеринбург, ул. Репина, 3
boroninalg@mail.ru

Федотова Галина Викторовна
Уральский государственный медицинский университет
Аспирант кафедры госпитальной педиатрии
Российская Федерация, 620028 г. Екатеринбург, ул. Репина, 3
tichcovagala@yandex.ru

Саматова Елена Валерьевна
Областная детская клиническая больница
К.м.н., врач-бактериолог лаборатории клинической микробиологии
Российская Федерация, 620149 г. Екатеринбург, ул. Серафимы Дерябиной, 32
lavrinenko@eka-net.ru

Вахлова Ирина Вениаминовна
Уральский государственный медицинский университет
Д.м.н., профессор, заведующая кафедрой госпитальной педиатрии
Российская Федерация, 620028 г. Екатеринбург, ул. Репина, 3
vachlova-61@mail.ru

Authors

Liubov G. Boronina
Ural State Medical University
Dr. Sci. (Med.), Professor, Clinical Laboratory and Bacteriology Diagnosis Department
Russian Federation, 620028, Yekaterinburg, 3 Repin str.
boroninalg@mail.ru

Galina V. Fedotova
Ural State Medical University
Graduate Student of Hospital Pediatrics Department
Russian Federation, 620028, Yekaterinburg, 3 Repin str.
tichcovagala@yandex.ru

Elena V. Samatova
Regional Children's Clinical Hospital
Cand. Sci. (Med.), Bacteriologist, Clinical microbiology laboratory
Russian Federation, 620149, Yekaterinburg, 32 Seraphima Deryabina str.
lavrinenko@eka-net.ru

Irina V. Vakhlova
Ural State Medical University
Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of Hospital Pediatrics
Russian Federation, 620028, Yekaterinburg, 3 Repin str.
vachlova-61@mail.ru.