

УДК 616.34-008.87

## ФОРМИРОВАНИЕ МИКРОФЛОРЫ ТОЛСТОЙ КИШКИ У ДЕТЕЙ

© 2012 г.

И.В. Соловьева<sup>1</sup>, И.В. Белова<sup>1</sup>, А.Г. Точилина<sup>1</sup>,  
Е.И. Ефимов<sup>1</sup>, А.С. Пожидаева<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. И.Н. Блохиной

<sup>2</sup> Нижегородский государственный технический университет им. Р.Е. Алексеева

lab-lb@yandex.ru

Поступила в редакцию 09.04.2012

Проанализирована база данных результатов бактериологического исследования микрофлоры толстой кишки 3268 человек. В процессе формирования микрофлоры с первого часа жизни участвуют аэробные и анаэробные микроорганизмы в равных количествах. Их нарастание идет параллельно, минуя «стадию трансформации». У «здоровых» детей в возрасте от 1 до 12 месяцев условно-патогенные микроорганизмы в значимых количествах обнаруживаются с наибольшей частотой. С взрослением частота их выделения снижается.

*Ключевые слова:* микроорганизмы, микрофлора кишечника, толстая кишка, дети, возрастные группы.

### Введение

Неоспоримым является факт ведущей роли микрофлоры пищеварительного тракта в процессе жизнедеятельности макроорганизма. Кишечная микрофлора, в частности бактерии толстой кишки, рассматривается как основная детерминанта здоровья и заболевания людей [1]. Важным и определяющим звеном в процессе формирования микробиоценоза является первичная колонизация бактериями новорожденного в раннем неонатальном периоде, так как в дальнейшем состояние здоровья индивидуума и резистентность к целому ряду заболеваний во многом зависят от характера кишечной микрофлоры и ее активности [2].

Становление микрофлоры желудочно-кишечного тракта в онтогенезе имеет этапность, обусловленную колонизацией кишечника в постнатальном периоде определенным набором родов и видов микроорганизмов [3].

Многочисленные работы как отечественных, так и зарубежных ученых свидетельствуют в пользу того, что внутриутробно развивающийся плод не является стерильным, а получает от матери какое-то количество индигенных микроорганизмов *in utero* [4–6]. Массивная же колонизация кишечника здорового доношенного младенца начинается в момент рождения, имеет определенные закономерности и состоит из нескольких последовательных стадий. Первая стадия – «условно асептическая» – берет начало в интранатальном периоде. Вторая – стадия «нарастающей колонизации» – наступает через

10–20 ч после родов и не зависит от степени зрелости, перинатальных условий развития плода и вида вскармливания [7]. В этот период колонизация осуществляется гетерогенными микроорганизмами, в первую очередь аэробными и условно аэробными бактериями, такими как кишечная палочка, стафилококки, клебсиеллы, энтерококки [8, 9].

С 3–5-го дня наступает третья стадия – «трансформация микрофлоры», в результате которой происходит вытеснение бифидофлорой других микроорганизмов. В этот период бифидобактерии становятся основной (резидентной) микрофлорой кишечника [3, 10, 11]. Доминирующее положение бифидофлоры начинает занимать к 5–20 дню жизни ребенка [12].

Проводя собственные исследования микрофлоры кишечника людей разного возраста, мы отметили высокую частоту обсеменения кишечника здоровых детей в возрасте от 1 месяца до 1 года условно-патогенными микроорганизмами (УПМ) в значимых количествах ( $10^5$  КОЕ/мл и более) [13]. Дети не имели клинических проявлений каких-либо заболеваний, в микрофлоре сохранялось превалирование анаэробных микроорганизмов (бифидобактерий, бактероидов) и микроаэрофилов – (лактобацилл, лактококков) над аэробными (*E. coli*, *Enterococcus spp.* и группы УПМ), но общее количество оппортунистических микроорганизмов превышало показатели нормы, регламентируемые в ОСТ [12]. Это побудило нас направить исследования на изучение процесса формирования и становления микрофлоры детей.

Цель работы – изучение особенностей формирования микробиоценоза кишечника детей, начиная с первых часов жизни, в условиях крупного промышленного центра.

### Экспериментальная часть

В рамках работы по изучению эндоэкологии человека нами было проведено исследование микрофлоры просвета толстой кишки 3268 людей различных возрастных групп, как «здоровых», так и «больных», проживающих на территории пятого по численности населения мегаполиса России – города Нижнего Новгорода (на 2011 г. численность населения – 1 255 159 человек).

В итоге были созданы электронная база данных и система управления базой данных, предназначенные для сбора, хранения, статистической обработки и графического представления результатов бактериологического исследования качественного и количественного состава микрофлоры ЖКТ людей различных возрастных групп, позволяющие решать следующие задачи: формирование запроса по любым полям базы данных в любых их сочетаниях; статистическую обработку данных и тест на однородность; выборку по различным критериям (по возрасту, по месту жительства или по лечебно-профи-лактическому учреждению, в котором находился пациент, по видам микроорганизмов и т.п.); графическое представление информации; постоянное пополнение картотеки обследуемых и анализ эффективности комплекса профилактических, лечебных и реабилитационных мероприятий и др. [14]. С использованием созданного программного продукта был проанализирован процесс формирования микрофлоры у младенцев.

К группе «здоровых» были отнесены дети, рожденные от здоровых матерей, не страдающих алкоголизмом, наркоманией и др., не имеющих хронических соматических и инфекционных заболеваний, болезней мочеполовой системы, в том числе кольпитов, не имеющих анемий, без отягощенного акушерско-гинекологического анамнеза (инфекционных осложнений при предыдущих беременностях, привычного невынашивания и т.п.), родоразрешившихся естественным путем, без кровотечений в послеродовом периоде, не получавших антибактериальную терапию в течение всего периода беременности, в родах и послеродовом периоде. Дети были доношенные, рождены в срок, весом от 2.6 до 4.0 кг, ростом от 46 до 54 см, оценка по шкале Апгар 8–10 баллов [15], без врожденных аномалий развития, не испытывавшие хроническую внутриутробную гипоксию, асфик-

сию в родах, не получившие травм в родах, не имевшие синдрома дыхательных расстройств, не получающие антибактериальную терапию. Материал на исследование отбирался в период санитарно-эпидемиологического благополучия в родильных домах.

Из 367 «здоровых» детей, обследованных в родильном доме, у 173 микробный пейзаж изучен в первые 24 часа жизни, а у 194 – на 1–7 сутки. В возрасте от 7 до 30 дней микрофлора исследована у 180 детей, от 1 до 12 месяцев – у 245, от 1 года до 6 лет – у 209.

К группе «больных» детей в возрасте от 0 до 168 часов были отнесены доношенные дети без врожденных уродств и выраженной патологии, отнесенные к подгруппе риска по развитию гнойно-воспалительных заболеваний по клиническим показателям состояния здоровья новорожденного по шкале Апгар (менее 8 баллов) и факторам пренатального риска у матери.

К «больным» в других возрастных группах были отнесены дети, на момент обследования которых отмечались клинические проявления острой формы заболеваний или обострения хронических заболеваний, или имевшие хронические заболевания в анамнезе, как получавшие антибактериальные и/или другие лекарственные средства, так и при первичном обращении до назначения этиотропной терапии, а также все не вошедшие в группу «здоровые». Из 373 «больных» детей, обследованных в родильном доме, у 123 микробный пейзаж изучен в первые 24 часа жизни, а у 250 – на 1–7 сутки. В возрасте от 7 до 30 дней микрофлора исследована у 178 детей, от 1 до 12 месяцев – у 290, от 1 года до 6 лет – у 235.

Изучение микрофлоры толстого кишечника проводилось в соответствии с Методическими указаниями «Бактериологическая диагностика дисбактериоза кишечника» по методу, разработанному Р.В. Эпштейн-Литвак и Ф.Л. Вильшанской и модифицированному в лаборатории НИИЭМ [16, 17].

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью непараметрического критерия *Kruskal–Wallis* (Краскала–Уоллиса) [18]. Различия между сравниваемыми группами считали статистически значимыми на уровне достоверности 0.05 ( $p < 0.05$ ).

### Результаты и их обсуждение

Как было сказано выше, в литературе описан процесс становления микрофлоры кишечника младенцев, отраженный на рис. 1.

Из графика видно, что в первые дни жизни кишечник младенца населяется энтеробактери-

ями в количестве  $10^9$  КОЕ/г фекалий [19]. По данным *Y. Venno* с соавторами [20], уже в первый день жизни, помимо энтеробактерий, в кишечнике обнаруживаются стрептококки, энтерококки и стафилококки, в то время как анаэробы – бифидобактерии, лактобациллы, бактероиды – обычно отсутствуют [2].

В результате анализа данных, полученных нами в ходе проведения исследований, было отмечено, что во вторую стадию «нарастающей колонизации» у «здоровых» младенцев идет активный рост как анаэробных микроорганизмов (лактобацилл, лактококков и бифидобактерий), так и аэробных (кишечной палочки, энтерококка и группы УПМ) в количествах  $10^5$ – $10^7$  КОЕ/г (рис. 2а, в).

На вторые сутки до  $10^8$  КОЕ/г увеличивается количество *E. coli*, на третьи сутки – количество облигатных анаэробов, а на пятые – количество УПМ. К шестым суткам, то есть к моменту выписки из родильного дома, в микрофлоре устанавливается равновесие аэробной и анаэробной частей флоры, далее происходит нарастание лакто- и бифидофлоры, и к 2 месяцам жизни ребенка она достигает значений  $10^9$ – $10^{10}$  КОЕ/г. Количество нормальной *E. coli* со вторых суток не изменяется и остается на уровне  $10^8$  КОЕ/г. Падение количества УПМ начинается с трехмесячного возраста, к шести годам оставаясь на уровне  $10^6$  КОЕ/г.

В первые 24 часа жизни процесс формирования микрофлоры в группе «больных» детей не отличался от такового у «здоровых» (рис. 2б, г).

На вторые сутки до  $10^8$  КОЕ/г увеличилось количество бифидобактерий и *E. coli*, количество лактобацилл и лактококков осталось на уровне  $10^7$  КОЕ/г. Уже к третьим-четвертым суткам пребывания в родильном доме установилось равновесие аэробной и анаэробной частей флоры на уровне  $10^8$  КОЕ/г. К седьмым суткам (к моменту выписки из родильного дома) отмечалось незначительное снижение количества УПМ до  $10^7$  КОЕ/г. Количество кишечной палочки и облигатных анаэробов оставалось на уровне  $10^8$  КОЕ/г. Далее вплоть до трех месяцев количественное соотношение микроорганизмов не менялось, и только на четвертый месяц увеличилось количество лактобацилл и лактококков до  $10^9$  КОЕ/г. Далее количественное соотношение микроорганизмов не менялось до шестилетнего возраста.

При сравнительном анализе формирования микробиоценоза кишечника у детей обращает на себя внимание следующая закономерность: общее количество выделяемых микроорганизмов из просвета кишечника у «здоровых» детей

было на уровне  $10^{10}$  КОЕ/г, в то время как у «больных» этот показатель был на два порядка ниже –  $10^8$  КОЕ/г (рис. 2а, б).

Проанализировав данные о частоте встречаемости отдельных представителей микробиоценоза просвета толстой кишки в микрофлоре «здоровых» людей различных возрастных групп, следует отметить, что в 93.8% дети рождаются с бактериальной флорой ЖКТ, причем в первые 24 часа жизни преобладающей флорой являются микроаэрофильные микроорганизмы родов *Lactobacillus* и *Lactococcus*, а также факультативно-анаэробные микроорганизмы родов *Staphylococcus* и *Escherichia*. Условно-патогенные микроорганизмы уже присутствуют в микрофлоре здоровых новорожденных, причем в 8.1% случаев в количествах  $\geq 10^5$  КОЕ/г. Далее, во время пребывания в родильном доме (1–7 суток) и в домашних условиях (от 7 суток до 1 года) происходит нарастание количества как анаэробной, так и аэробной частей флоры (рис. 3а). Частота выделения, видовое разнообразие условно-патогенной флоры в значимых количествах ( $\geq 10^5$  КОЕ/г) и обнаружение их в ассоциациях по 3, 4 и более вида нарастает в период сукцессий и достигает своего пика в возрасте от одного месяца до одного года, а далее происходит снижение частоты выделения УПМ.

В отличие от «здоровых», у «больных» детей в возрасте от 1 месяца до 1 года наблюдается резкое снижение частоты выделения представителей анаэробной части флоры (лактобацилл и бифидобактерий). Следует отметить тот факт, что частота выделения условно-патогенных видов в значимых количествах ( $10^5$  КОЕ/г и более) в группе «больных» детей была ниже, чем в группе «здоровых», особенно это заметно в возрастных группах от 7 до 30 суток и от 1 месяца до 1 года (37% и 50%, 29.5 и 91.6% соответственно) (рис. 3б). В ассоциациях УПМ выделялись чаще у «больных» детей, чем у «здоровых» во всех возрастных группах, кроме группы детей от 1 месяца до 1 года (рис. 4).

Аккумулируя данные литературы и результаты собственных исследований, профессор В.М. Бондаренко [21], объясняя развитие эндогенной инфекции, говорит о том, что в организме здоровых детей происходит процесс формирования местной толерантности к части нормальной микрофлоры, являющийся защитной реакцией организма, направленной на поддержание в нем стабильного микробиоценоза. Этот процесс развивается в первые месяцы жизни ребенка при его начальном контакте с микрофлорой и продуктами питания через так назы-

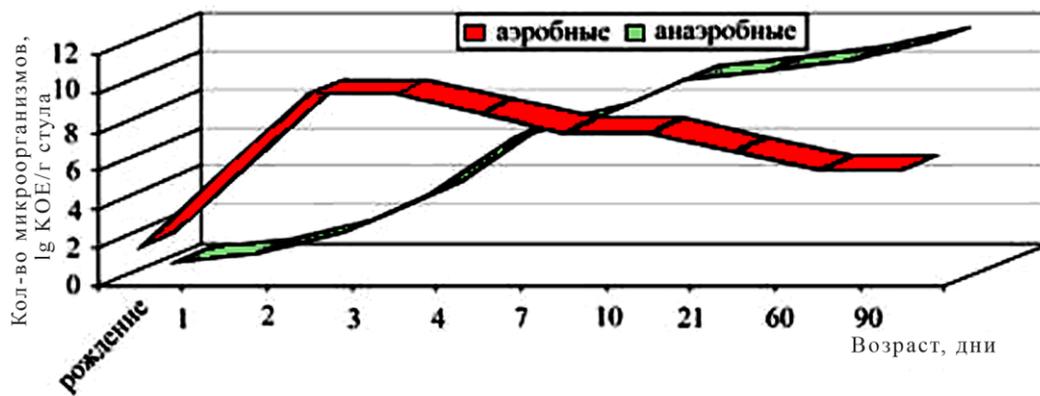


Рис. 1. Фазы формирования микробиоценоза в постнатальном периоде (приведены усредненные значения количества микроорганизмов) (по О.К. Нетребенко, [2])

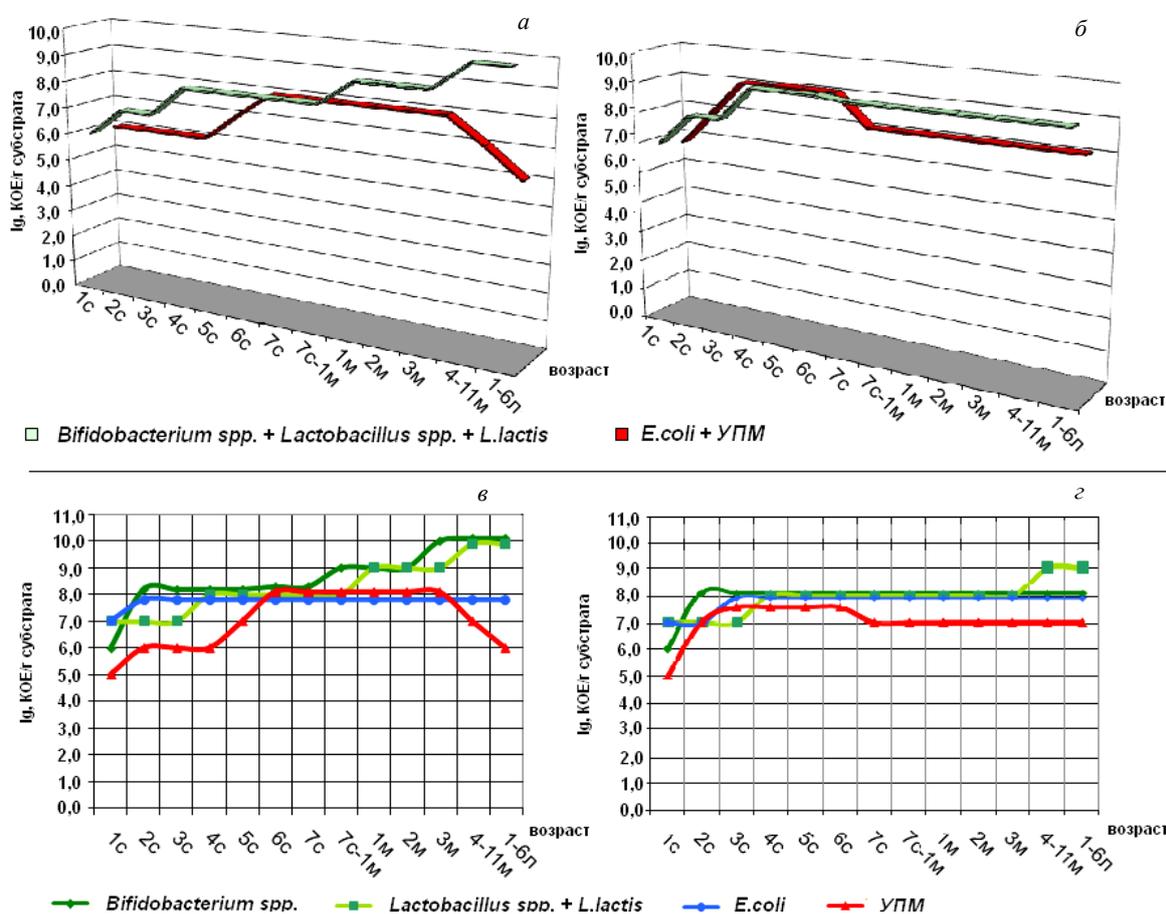


Рис. 2. Фазы формирования микробиоценозов групп «здоровых» (а, в) и «больных» (б, г) детей (приведены усредненные значения количества микроорганизмов)

ваемое «первичное воспаление», захватывающее всю субэпителиальную лимфоидную ткань. Для развития местной толерантности необходимо многократное повторное введение малых доз антигена, при этом важную роль играют супрессия образ-распознающих рецепторов в

ответ на контакт с микробом и регуляторные Т-лимфоциты. У больных детей под влиянием самого заболевания и, как правило, массивной фармакотерапии происходит образование белков теплового шока, снижающих чувствительность микроба к воздействию неблагоприятных

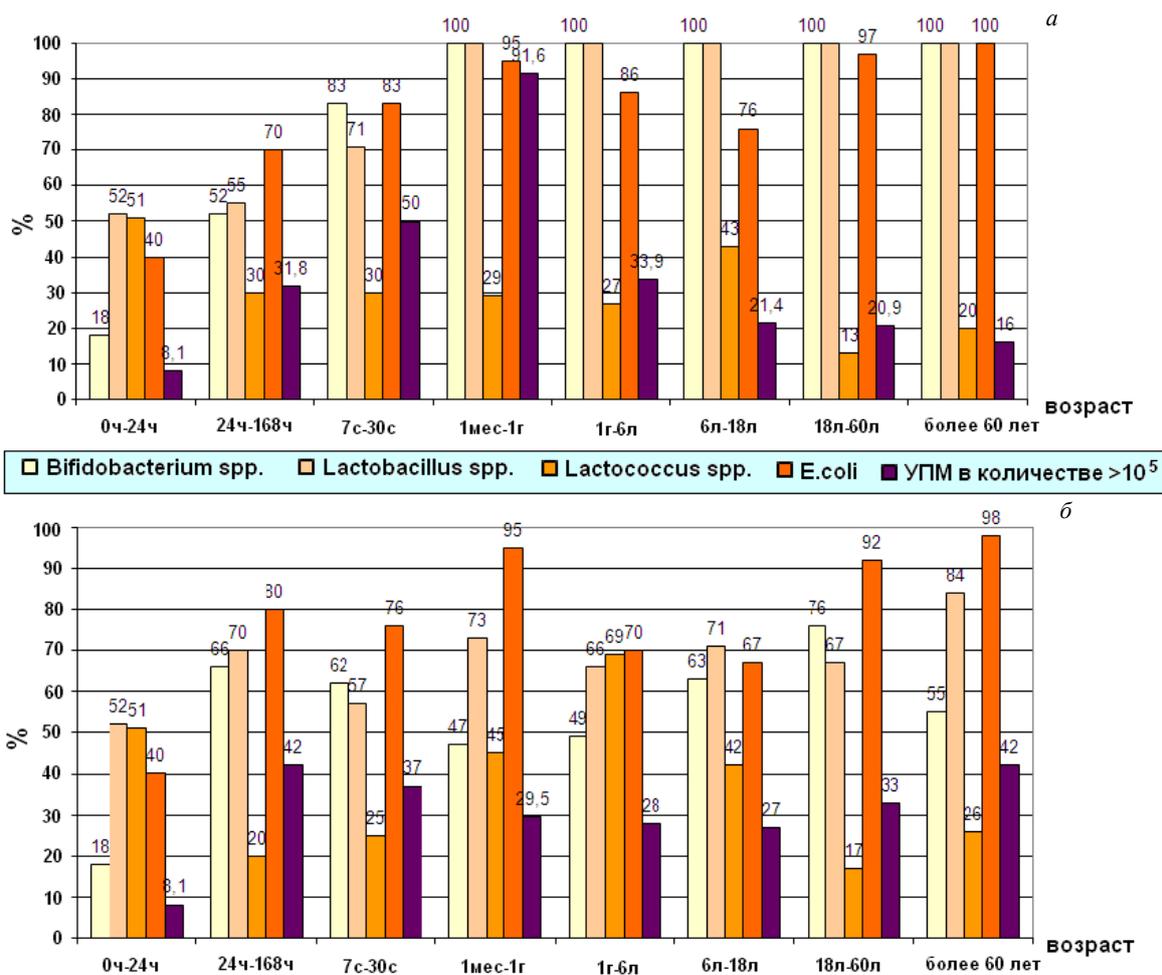


Рис. 3. Частота выделения представителей облигатной кишечной микрофлоры и УПМ из кишечника «здоровых» (а) и «больных» (б) людей разных возрастных групп

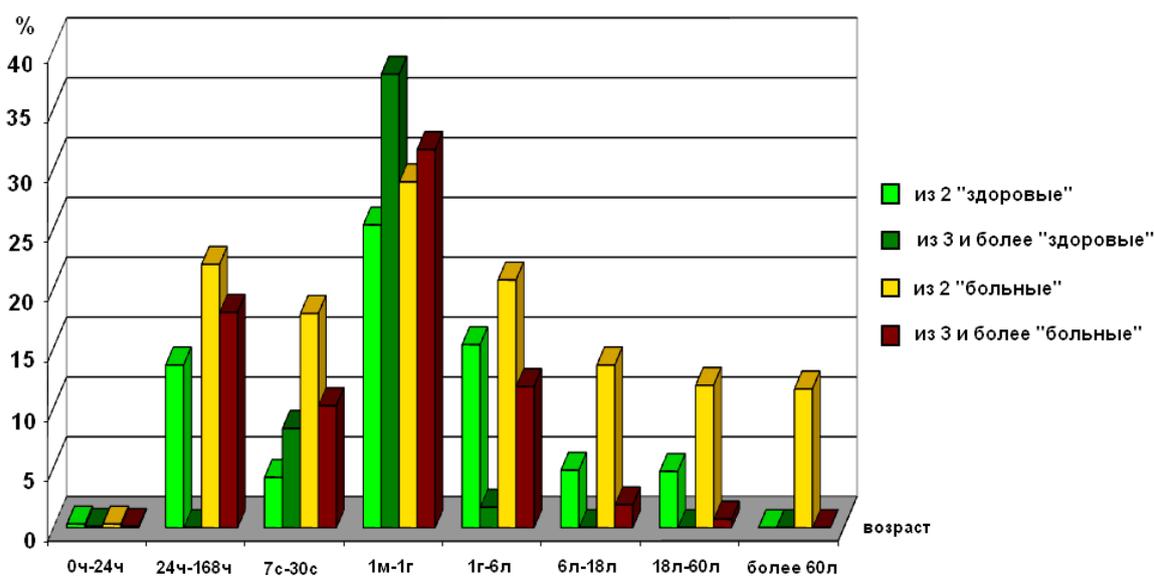


Рис. 4. Частота обнаружения ассоциаций УПМ у «здоровых» и «больных» детей разного возраста

факторов. Эти белки являются сильными лигандами для Toll-подобных рецепторов, вызывая активацию клеток и продукцию ими цитокинов. Учитывая это, есть все основания предполагать, что как эпителиальные, так и другие клетки иммунной системы будут активно реагировать на такие микроорганизмы, к которым ранее имела реактивность. Микробы, приобретшие новый набор антигенов, воспринимаются образ-распознающими рецепторами эпителиальных клеток как чужеродные. Колонии таких микробов провоцируют образование на данном участке слизистой высокой концентрации хемокинов, достаточной для привлечения к нему значительного числа клеток естественного иммунитета, выбрасывающих триггерную концентрацию провоспалительных цитокинов, инициирующих воспалительный ответ с повреждением слизистой. Полагают, что «дисбиозные» микроорганизмы колонизируют эпителий кишечника при наличии свободных участков слизи, которые могут появляться в условиях подавления нормальной микрофлоры. Эти микроорганизмы, формирующие на поверхности слизистой свою биопленку, воспринимаются как чужеродные и также инициируют развитие эндогенной инфекции [21]. В связи с этим, возникновение патологического процесса можно объяснить не количеством выделяемых УПМ, а их измененными свойствами и подавлением лакто- и бифидобактерий.

Для подавления патологического процесса необходимо нормализовать ткани в очаге воспаления, в том числе и эпителиальный слой слизистой кишечника, и восстановить местную толерантность организма к облигатной микрофлоре. Активизировать эти процессы и восстановить нарушенную микроэкологию и иммунные реакции можно с помощью применения различных пробиотических препаратов. Проанализировав полученные данные по процессу формирования микрофлоры, в целях профилактики раннего формирования дисбиотического синдрома наряду с бифидосодержащими препаратами, начиная с седьмых суток до конца первого года жизни, мы считаем целесообразным применять пробиотики и продукты питания, содержащие лактобациллы и лактококки.

### Выводы

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что в процессе формирования микрофлоры с первых часов жизни участвуют как аэробные, так и анаэробные микроорганизмы, причем в равных соотношениях.

Процесс нарастания анаэробной компоненты (лакто- и бифидофлоры) идет параллельно с ростом УПМ и кишечной палочки, минуя стадию «трансформации». Уменьшение количества УПМ в микрофлоре «здоровых» детей начинается после года. Общее количество микроорганизмов, выделяемых из просвета толстой кишки «здоровых» детей, на два порядка выше, чем у «больных». С наибольшей частотой УПМ ( $\geq 10^5$  КОЕ/г) выделяются в группе «здоровых» детей в возрасте от 1 месяца до 1 года. С возрастом частота обнаружения УПМ снижается. В связи с вышесказанным, для оценки состояния микрофлоры, особенно у детей первых 6 лет жизни, необходим многофакторный анализ результатов бактериологического исследования: следует учитывать не только объективный показатель количества отдельных родов и видов микроорганизмов, но и относительные показатели соотношения их количеств в биоценозе.

### Список литературы

1. Тутельян В.А., Попова Т.С. Новые стратегии в лечебном питании. М.: Медицина, 2002. 144 с.
2. Нетребенко О.К. Питание грудного ребенка и кишечная микрофлора // Педиатрия. 2005. № 3. С. 53–57.
3. Дисбиоз кишечника. Руководство по диагностике и лечению / Под ред. Е.И. Ткаченко, А.Н. Суворова. СПб.: ИнформМед, 2009. 276 с.
4. Глушковой О.А. Роль биоценоза кишечника беременной женщины во внутриутробном инфицировании плода и пути его коррекции. Дис. ... канд. мед. наук. Нижний Новгород, 2000. 202 с.
5. Бочков И.А., Юрко Л.П., Юдицкая Н.М. Состояние микрофлоры толстой кишки у детей раннего возраста (по материалам амбулаторных обследований) // Инфекц. болезни. 2004. Т. 2. № 3. С. 83–85.
6. Martin R. et al. The commensal microflora of human milk new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics // Trends Food Sci. Tech. 2004. V. 15. P. 121.
7. Fanaro S., Chierici R., Guerrini P., Vigi V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development // Acta pediat. 2003. V. 91 (441). P. 48–55.
8. Orrhagt K., Nord C.E. Factors controlling the bacterial colonization of the intestine in breastfed infants // Acta Pediatr. Suppl. Aug. 1999. V. 88 (430). P. 47–57.
9. Edwards C.A., Parret A.M. Intestinal flora during the first months of life: new perspectives // Br. J. Nutr. 2002. V. 88. № 11. P. 11–18.
10. Шабалов Н.П. Неонатология. М.: Медпресс-информ, 2004. С. 128–129.
11. Нетребенко О.К. Питание и развитие иммунитета у детей на разных видах вскармливания / Педиатрия. Журн. им. Г.Н. Сперанского. 2005. № 6. С. 50–56.
12. ОСТ 91500.11.0004-2003. Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника. Утвержден при-

казом МЗ РФ №231 от 09.06.2003. Москва, 2003. 173 с.

13. Соловьёва И.В., Гелашвили Д.Б., Варичев А.Н. и др. Видовая структура биопленки толстой кишки здоровых и больных детей различных возрастных групп // Медицинский альманах. 2011. № 4 (17). С. 89–93.

14. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ «Автоматизированная система микробиологического мониторинга желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) № 2011614233 / Ломакин Д.В., Вигура А.Н., Губернаторов В.П., Пожидаева А.С., Соловьёва И.В., Ефимов Е.И., Белова И.В. / заявлено 13.04.2011; зарег. 30.05.2011.

15. Сирс У., Сирс М. Ваш малыш от рождения до двух лет. М.: Эксмо, 2011. 912 с.

16. Эпштейн-Литвак Р.В. и др. Бактериологическая диагностика дисбактериоза. Методические рекомендации. М., 1977. 20 с.

17. Диагностика и биокоррекция нарушений антиинфекционного гомеостаза в системе «мать-дитя»: Книга для практического врача / Под ред. Е.И. Ефимова, К.Я. Соколовой. Н. Новгород: Изд-во НГМА, 2004. 376 с.

18. Сергиенко В.И., Бондарева И.Б. Математическая статистика в клинических исследованиях. 2-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. 304 с.

19. Goldman A.S. Modulation of the gastrointestinal tract of infants by human milk. Interfaces and interactions. An evolutionary perspective // J. Nutr. 2000. N 130 (2). P. 426–431.

20. Benno Y., Sawada K., Mitsuoka T. The intestinal microflora of infants: composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants // Microbiol. Immunol. 1984. V. 28. N 9. P. 975–986.

21. Бондаренко В.М. Роль условно-патогенных бактерий кишечника в полиорганной патологии человека. М.-Тверь: ООО «Изд-во «Триада», 2007. 64 с.

## FORMATION OF THE COLON MICROFLORA IN CHILDREN

*I.V. Solovyeva, I.V. Belova, A.G. Tochilina, E.I. Efimov, A.S. Pozhidaeva*

The database of results of bacteriological research of the colon microflora of 3268 people is analysed. In the course of microflora formation from the first hour of life, aerobic and anaerobic microorganisms participate in equal amounts. Their increase occurs in parallel, skipping the «transformation stage». In the «healthy» children group aged 1 to 12 months, opportunistic microorganisms in significant quantities occur with the greatest frequency. With age, the occurrence of these microorganisms decreases.

*Keywords:* microorganisms, intestinal microflora, colon, children, age groups.