

На правах рукописи

Крикун Виктория Сергеевна

**БИОЦЕНОЗСБЕРЕГАЮЩАЯ ТЕРАПИЯ ПРИ ОСТРЫХ
БАКТЕРИАЛЬНЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЯХ У ДЕТЕЙ:
ОБОСНОВАНИЕ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ**

3.1.22. Инфекционные болезни

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2024

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель:

Горелов Александр Васильевич – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научной работе ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт Эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Официальные оппоненты:

Павелкина Вера Фёдоровна – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой инфекционных болезней с курсами эпидемиологии, фтизиатрии, дерматовенерологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Халиуллина Светлана Викторовна – доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры детских инфекций Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «___» _____ 2025 года в _____ час. _____ мин. на заседании диссертационного совета Д 64.1.010.01 в Федеральном бюджетном учреждении науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д.3а.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и на сайте института www.crie.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Николаева Светлана Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Острые кишечные инфекции (ОКИ) остаются важной проблемой здравоохранения ввиду массовости, тяжелого течения, неблагоприятных исходов и связанного с ними экономического ущерба. Они занимают второе место в структуре инфекционных болезней у детей после острых респираторных инфекций, причем данная ситуация последнее десятилетие остается практически неизменной [Николаева С.В., Усенко Д.В., 2019]. Это представляет существенную проблему в педиатрической практике, которая усложняется высокой смертностью от кишечных инфекций, особенно в раннем детском возрасте [Гончар Н.В., 2021].

Согласно данным ВОЗ, ежегодно в мире регистрируется более 1.5 млрд. случаев диареи. По статистике, в развивающихся странах дети до трех лет болеют диареей в среднем не менее трех раз в год. А в структуре детской смертности они занимают лидирующие позиции [Усенко Д.В., Горелов А.В., 2020; Одинцова В.Е., Каштанова Д.А., 2020]. Истинная частота ОКИ остается неизвестной, поскольку регистрация случаев происходит по обращаемости. Так, в 2021г. — после резкого снижения в 2020г. — отмечается тенденция к росту: 343,845 на 100 тысяч населения, из них большая часть дети. К сожалению, как и ранее, в структуре ОКИ преобладают инфекции неустановленной этиологии. Среди возбудителей бактериальных диарей основную долю составляют сальмонеллы, кампилобактер, шигеллы, патогенные эшерихии. По итогам 2021г. число случаев сальмонеллезной инфекции составляло 13,61 на 100 тысяч населения, так, по сравнению с 2020г., показатель достоверно не изменился [Ермоленко К.Д., Лобзин Ю.В., 2022].

Изменение микробиоценоза кишечника, безусловно, играет важную роль в патогенезе острых кишечных инфекций (ОКИ). Дисбаланс микрофлоры может привести к усилению воспалительного процесса, что увеличивает риск развития тяжелых форм заболевания и возможных осложнений. Понимание этого процесса помогает в разработке новых подходов в лечении и профилактике инфекционных заболеваний кишечника. Важно также учитывать, что микробиоценоз может быть изменен не только самой инфекцией, но и влиянием на него различной терапии, в частности антибактериальной, которая, в свою очередь, нарушает баланс полезных и патогенных микроорганизмов. Сегодня очевидно, что совокупность микроорганизмов — «микробиом» — представляет собой огромный микробный «орган» человека, который не уступает по функциональной значимости другим органам человека [Шумилов П. В., 2015; Стома И.О., 2021].

Микробиоценоз кишечника человека играет важную роль в поддержании гомеостаза организма, однако он может быть подвержен изменениям при патологических состояниях, которые приводят к изменению доли участия микроорганизмов в физиологических процессах. Возникает дисбаланс в снабжении других органов зависимыми от микробов веществами, нарушается гомеостаз метаболических процессов, стабильность иммунной системы. Если изменения превосходит компенсаторные ресурсы организма, это может привести к увеличению вероятности реализации негативных функций микробиоценоза, таких как: становление источников эндогенной инфекции (гнойно-септических и других болезней); сенсибилизация (в виде аллергических проявлений); сохранение плазмидных генов; мутагенная активность.

В отличие от взрослых, у детей для микробиоценоза кишечника в целом характерна меньшая устойчивость в первые три-пять лет жизни, когда он находится на стадии формирования, в связи с чем обладает высокой индивидуальной вариабельностью видового состава, в особенности у детей первого года [Лобзин Ю.В 2016]. Нарушение баланса микробиоценоза на данном этапе развития может в дальнейшем иметь если и не

манифестные в ближайшей перспективе, то непредсказуемые и далеко идущие последствия для здоровья ребенка. Это становится особенно актуальным при внешнем стрессовом воздействии на систему микробиоценоза, назначении антибиотиков, в частности при острых кишечных инфекциях. [Феклисова Л.В., 2016; Усенко Д.В., Горелов А.В., 2021]. Учитывая, что наиболее частым проявлением дисбиоза является антибиотик-ассоциированная диарея, это является особенно актуальным в наше время [Плоскирева А.А., 2018, Szajewska H., 2022].

Внедрение новейших методов молекулярно-генетического анализа значительно расширило представления о составе и функциях кишечного микробиоценоза. Благодаря им стало очевидно, что данные, полученные в прошлом с использованием бактериологического метода исследования, по составу микробиоты и ее изменению при различных заболеваниях и состояниях отражают лишь «верхушку айсберга», в то время как разнообразие населяющих организм человека микроорганизмов огромно [McFarland L.V.2014]. Эту скрытую биосферу удалось обнаружить лишь благодаря современным методам метагеномного секвенирования [Тягт А.В. 2014]. Именно поэтому секвенирование 16S рРНК бактерий в образцах кала как метод оценки состояния микробиоценоза ЖКТ можно считать «золотым стандартом».

В настоящий момент новые методы молекулярно-генетического изучения микробиоценоза находятся на стадии разработки и внедрения. Несмотря на недостаточное клиническое осмысление полученных данных, именно они открывают новые перспективы более глубокого понимания микробного взаимодействия, в том числе роли состояния микробиоценоза при развитии острых кишечных инфекций у детей, а также своевременной коррекции сдвига микробиоценоза, возникшего, с одной стороны, на фоне агрессивного воздействия внешнего возбудителя, с другой — на фоне проведения антибактериальной терапии.

Проведение данного исследования представляется особенно актуальным, так как до настоящего времени на территории Российской Федерации не было проведено работ, посвященных оценке состояния микробиоценоза при острых кишечных инфекциях, с использованием современных молекулярно-генетических методов. Отсутствует оценка характера течения, также нет ясности в вопросе о влиянии степени изменений микробиоценоза на прогноз болезни, длительности процесса, формировании возможных осложнений и участия в этом антибактериальных препаратов.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время не вызывает сомнения факт того, что микробиоценоз человека — это совокупность взаимодействующих между собой микроорганизмов, которые занимают многочисленные экологические ниши на коже и соприкасающихся с окружающей средой слизистых оболочках человеческого тела: желудочно-кишечный тракт (ЖКТ), респираторный тракт, урогенитальный тракт и ротовая полость. Микробиоценоз человека включает тысячи видов бактерий, бактериофагов, эукариотических вирусов, архей, плесневых и дрожжеподобных грибов. Он состоит из 10-100 триллионов симбиотических микробных клеток, что в более чем 10 раз превосходит наши соматические и зародышевые клетки, при этом общая масса всей микробиоты человека составляет от 1 до 3% массы его тела [Стома И.О., 2021; Ивашкин В.Т., 2022; Горелов А.В., Усенко Д.В., 2023]. К настоящему моменту доказано, что у детей для микробиоценоза кишечника, в целом, характерна меньшая устойчивость в первые годы жизни, в особенности у детей до года [Лобзин Ю.В., 2016].

Симбиотическая микробиота слизистых играет важную роль в обеспечении здорового гомеостаза нашего организма: она предотвращает колонизацию организма экзогенными микроорганизмами, в том числе патогенными, и их избыточный рост посредством синтеза химических веществ, конкуренции за источники питания и места прикрепления на слизистых оболочках. Коллективные геномы микробных симбионтов

организма человека кодируют около 10 миллионов генов, что превосходит по численности геном человека, по данным различных источников, в 100-150 раз [Корниенко Е.А., Кафарская Л.И., 2021].

Общепризнано, что важным аспектом сохранения здоровья человека является поддержание нормального функционирования его микробиоценоза. Такие негативные влияния как нерациональная антибактериальная терапия, острые кишечные инфекции, действие токсических веществ и неправильное питание, могут приводить к тому, что функции микробиоценоза могут нарушаться, что приводит к развитию целого ряда заболеваний-от поражения желудочно-кишечного тракта, до развития системных воспалительных реакций [Усенко Д.В., Горелов А.В., 2021]. Изменение микробиоценоза кишечника является одним из ключевых факторов патогенеза воспалительного процесса при острых кишечных инфекциях и, пожалуй, играет немаловажную роль в особенностях развития заболевания, тяжести течения, а также возможных осложнений [Maciel-Fiuza M.F.2023].

В литературе имеется достаточное количество данных об изменении микробиоты при различных заболеваниях, например, экземе, бронхиальной астме, атопическом дерматите, ожирении, сахарном диабете, воспалительных заболеваниях кишечника [Zhuang L. 2019].

Новую эру в расширении знаний о составе и функциях кишечного микробиоценоза оказали разработка и внедрение новейших методов молекулярно-генетического анализа. Стало очевидно, что данные по составу микробиоты и ее изменению при различных заболеваниях и состояниях, полученные в прошлые годы с использованием бактериологического метода исследования, не отражают истинной картины происходящего, а также возможные дисбиотические сдвиги, происходящие в организме человека [McFarland L.V.2014]. Поэтому метод оценки состояния микробиоценоза ЖКТ на основе секвенирования 16S рРНК бактерий в образцах кала в XXI веке отнесен к «золотому стандарту».

До настоящего времени в Российской Федерации не было проведено работ, посвященных оценке состояния микробиоценоза при острых кишечных инфекциях посредством молекулярно-генетических методов. Отсутствует оценка патогенетического вклада, выраженности степени изменений микробиоценоза в разные фазы болезни, а также влияния на длительность процесса, формирование возможных осложнений и необходимость коррекции, в частности при назначении антибактериальных препаратов.

Решению данной задачи посвящена настоящая работа.

Цель исследования:

Оптимизация этиотропной терапии бактериальных ОКИ у детей на основании изучения клинико-лабораторной эффективности антибактериальной терапии и изменений в микробиоценозе кишечника.

Задачи исследования:

1. Проанализировать структуру стартовой этиотропной терапии бактериальных ОКИ у детей на современном этапе.
2. Изучить клинико-лабораторную характеристику пациентов с бактериальными ОКИ на фоне используемых антибактериальных препаратов.
3. Оценить динамику изменений микробиоценоза ЖКТ на фоне приема антибактериальной терапии при бактериальных ОКИ.
4. Оптимизировать алгоритм биоценозсберегающей терапии при бактериальных ОКИ.

Научная новизна исследования:

Представлены новые аспекты патогенеза ОКИ, в частности данные о динамическом изменении и дестабилизации иерархической структуры состояния микробиоценоза

кишечника с использованием метода секвенирования нуклеиновых кислот (гена 16S рРНК) в разные фазы инфекционного процесса при острых кишечных инфекциях инвазивного генеза в зависимости от возраста больных и особенностей проводимой терапии.

Сформулирована и научно обоснована новая научная идея, позволившая охватить научную концепцию о дисфункции микробиома ЖКТ. Выявлены новые закономерности исследуемого явления, а также разработаны новые биоценозсберегающие терапевтические подходы терапии бактериальных ОКИ у детей.

Определены клинико-лабораторные особенности острых кишечных инфекций различной этиологии в зависимости от выявленного текущего состояния микробиоценоза кишечника, анализ которых позволил оптимизировать проводимую терапию и минимизировать ущерб от перенесенной инфекции.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Полученные в ходе исследования данные позволили уточнить спектр антибактериальных препаратов, наиболее широко применяемых в клинической практике.

Определены значимость и место МАНК (16S рРНК) для научно-теоретического познания ОКИ и их последствий, а также его возможности и целесообразность применения в рутинной клинической практике лечения ОКИ.

Результаты данной работы дают практикующим врачам более глубокое представление о происходящих изменениях в микробиоценозе и возможностях прогнозирования течения заболевания при ОКИ различной этиологии. Комплексная оценка состояния микробиоценоза ЖКТ также позволила оптимизировать подходы к назначению антибактериальной и пробиотической терапии.

Разработан алгоритм по ведению и терапии данной категории больных, что в свою очередь приводит к улучшению исхода заболевания.

Методология и методы исследования

Методологическую основу исследования составили научно обоснованные концепции, освещающие вопросы изменения микробиоценоза в различные фазы инфекционного процесса и влияния на него антибактериальной терапии. Выполнены ретроспективное и проспективное исследования, которые носили комплексный характер и включали в себя: отбор пациентов, осмотр, сбор жалоб и анамнеза, наблюдение за пациентами, работа с медицинской документацией. В ходе работы автором самостоятельно усовершенствован алгоритм биоценозсберегающей терапии (ОКИ) на современном этапе. Также автор самостоятельно проводил анализ всех полученных данных, включая выполнение статистической обработки.

Положения, выносимые на защиту

- Проведенный анализ позволил установить современный тренд стартовой терапии бактериальных ОКИ у детей во всех возрастных группах. Наиболее часто назначают Нифуроксазид (36%), Цефалоспорины III поколения (21%), а при легких формах бактериальных ОКИ у детей в качестве монотерапии (33%) — пробиотики.
- Назначение Нифуроксазида или Цефалоспоринов III поколения в качестве стартовой терапии бактериальных ОКИ демонстрирует сопоставимую клинико-лабораторную эффективность, сокращает сроки выздоровления.
- В дебюте бактериальных ОКИ, до начала лечения с помощью молекулярно-генетического метода, выявлены значительное сокращение разнообразия микробиоты по сравнению со здоровыми детьми ($p=0,0036$ для индекса Шеннона, $p=0,0042$ для индекса Чоу 1), рост доли условно патогенных семейств: Enterobacteriaceae, Enterococcaceae, Bacteroidaceae, изменение их отношения к доле комменсальных микроорганизмов Ruminococcaceae и Veillonellaceae.

- Применение нифуроксазида при бактериальных ОКИ у детей, в отличие от цефалоспоринов III поколения, не усугубляет микробиологических нарушений ЖКТ, тогда как к моменту окончания терапии цефалоспорином, при том, что разнообразие видов микроорганизмов (альфа-разнообразие) значимо не изменялось, сохранялись исходно выявленные нарушения: повышенная доля условно патогенных видов и низкий уровень комменсалов, возростал потенциал устойчивости к антибиотикам бета-лактаминового ряда.
- Стартовая терапия бактериальных ОКИ у детей должна базироваться на дифференцированном назначении антибактериальных препаратов в зависимости от биоценозсберегающего потенциала и пробиотиков. Назначение *Saccharomyces boulardii* совместно с антибиотиками является эффективным и безопасным для лечения и профилактики *Cl. difficile* — ассоциированных диарей.

Личное участие автора в получении результатов

Автором разработан дизайн исследования, осуществлен отбор пациентов с учетом критериев включения и исключения, являющийся фундаментальным этапом, который позволил обеспечить надежность и валидность результатов. Определены цели и задачи, методы исследования и сформированы выводы. Автором проведены тщательный и всесторонний обзор и анализ отечественной и иностранной литературы по теме исследования. С участием автора осуществлены все этапы исследования, включая забор биологического материала (кала), правильное хранение и транспортировка с целью дальнейшего проведения 16S секвенирования рРНК. Одним из немаловажных этапов в исследовании, который позволил подтвердить достоверность выводов и обеспечил объективность полученных результатов, является проведенная автором статистическая обработка результатов.

Достоверность выводов и рекомендаций

Диссертационное исследование демонстрирует высокий уровень надежности и научной строгости. Сопоставимость характеристик групп пациентов и достаточный объем выборки обеспечивают валидность результатов. Комплексный подход к диагностике и использование компьютерных программ для анализа данных с применением современных статистических методов укрепляют обоснованность выводов и рекомендаций.

Внедрение результатов исследования

Научные находки внедрены в лечебно-диагностический процесс отделений Сеченовского центра материнства и детства Первого МГМУ имени И.М. Сеченова. Их используют в образовательной программе ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора для подготовки специалистов по дисциплинам «Инфекционные болезни», «Педиатрия», что подчеркивает значимость и актуальность данной работы. Разработанное пособие для врачей «Практические рекомендации по терапии инвазивных острых кишечных инфекций у детей» Москва, 2024, является важным ресурсом для обучения и повышения квалификации медицинских работников.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Фрагменты диссертационной работы были представлены на Международных конференциях и конгрессах: XVIII Научно-практической конференции «Совершенствование педиатрической практики. От простого к сложному», посвященной 191-летию со дня рождения основателя Кафедры и Клиники детских болезней в Московском Императорском Университете, профессора, Тольского Николая Алексеевича (2023, Москва), на научно-практической конференции молодых ученых и специалистов ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора «Проблемы эпидемиологии, терапии и лабораторной диагностики инфекционных заболеваний» (2024, Москва).

Диссертация апробирована на заседании апробационного совета Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт

Эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 11 июня 2024 года, протокол №83.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует шифру научной специальности: 3.1.22. «Инфекционные болезни». Результаты соответствуют направлениям исследований в пунктах 1, 2, 3, и 4 паспорта научной специальности 3.1.22. «Инфекционные болезни».

Публикации

Основные научные результаты по теме диссертации изложены в 5 печатных работах, в том числе в 3 журналах, рекомендованных ВАК РФ по профилю специальности «Инфекционные болезни» для публикации основных положений диссертационной работы.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа представлена в виде рукописи на 143 страницах машинописного текста, которые проиллюстрированы 9 таблицами и 41 рисунками. Структура работы включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, а также главы с результатами собственных исследований, заключение, выводы и практические рекомендации. Список литературы содержит 213 источников, из них 111 отечественных и 102 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на базе клинического отдела инфекционной патологии ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора (заведующий — доктор медицинских наук Понежева Ж.Б.).

Набор материала проводился на базе ИКБ №2 Департамента здравоохранения г. Москвы (главный врач — Краснова С.В.) с 2018 по 2020 гг. На базе Клинического центра «Университетская детская клиническая больница» ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (главный врач — кандидат медицинских наук Грибова Э.П.) кафедры детских болезней лечебного факультета ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (заведующий кафедрой — доктор медицинских наук, профессор Геппе Н.А.) в период с 2018 по 2020 гг. На базе ГАУЗ МО ЦГКБ г. Реутов детского инфекционного отделения (заведующий отделением — врач высшей категории Ивакина Н.А.) в период с 2018 по 2020 гг. В детском инфекционном отделении Химкинской Центральной Клинической Больницы (заведующий отделением — врач высшей категории Барыкин В.И.) в периоды с 2018 по 2020 гг. и в период с 2021 по 2023 гг.

Для достижения поставленной цели был разработан дизайн исследования (Рисунок 1). Добровольное информированное согласие на участие в исследовании было получено от всех пациентов. На I этапе исследования ретроспективно проводился учёт спектра применения антибактериальных препаратов различных групп в терапии бактериальных ОКИ у детей. Всего за указанные периоды было пролечено 674 ребенка от 6 мес. до 12 лет, обоого пола, с бактериальными ОКИ. Предварительный диагноз острых кишечных инфекций (ОКИ) у детей выставлялся на основании: Клинических рекомендаций по диагностике и лечению острых кишечных инфекций у детей (Горелов А.В., Милютин Л.Н., Усенко Д.В., 2005), утвержденных Минздравом РФ; клинических рекомендаций оказания медицинской помощи детям с ОКИ, предложенных ФГБУ НИИДИ ФМБА России (2015 г.); принципов Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) (2015 г.); Рекомендаций Европейского общества детских гастроэнтерологов, гепатологов и нутрициологов (ESPGHAN) (2014 г.) Данные рекомендации обеспечивают стандартизированный подход к диагностике и лечению ОКИ. Всем пациентам назначалось обследование, включая: бактериологическое, копрологическое исследование, ПЦР кала,

клинический анализ крови и мочи. Степень эксикоза (дегидратации) устанавливали по проценту потери массы тела и клинической шкале дегидратации (Воротынцева Н.В., 1996; CDS — Clinical Dehydration Scale). При потере массы тела до 5% и сумме 1-4 баллов по CDS устанавливали 1 степень эксикоза, от 5 до 10% и 5-8-ми баллов — 2 степень. Комплексное лечение острых кишечных инфекций (ОКИ) у детей соответствовало установленным стандартам оказания медицинской помощи детям и включало в себя: дезинтоксикацию, регидратацию (пероральная регидратация низкоосмолярными растворами являлась предпочтительным, при неэффективности применялась инфузионная терапия глюкозо-солевыми растворами), антибактериальную терапию (по показаниям с учетом возраста, клинической картины и тяжести заболевания), назначение энтеросорбентов, пробиотиков, при наличии гемоколита — гемостатиков, а также проведение симптоматической терапии (жаропонижающей, спазмолитической и др.). В возрастной структуре преобладали дети от 1-3 лет (35%) и от 6-12 лет (36%). Дети из возрастной группы до 1 года составили лишь 9%. Мальчиков было больше, чем девочек, во всех возрастных группах, исключение составила группа детей до 1 года. Все больные ОКИ были со среднетяжелой и легкой формой заболевания. На втором этапе исследования проведена клиническая оценка эффективности антибактериальных препаратов, которые, по нашим данным, наиболее часто применяют в лечении бактериальных ОКИ у детей (препарат нифуроксазид (нифуросазид), цефалоспорины третьего поколения). Основным критерием включения детей в исследование было наличие «инвазивного» типа диареи. Исходя из проводимой антибактериальной терапии, дети были распределены на следующие группы: 1 группа (основная группа) — 60 детей, получавшие в качестве этиотропной терапии Нифуроксазид в возрастной дозировке: детям от 6 мес. до 3 лет — 100 мг нифуроксазида (2,5 мл суспензии) 3 раза в сутки; детям 3-6 лет — по 200 мг нифуроксазида (5 мл суспензии) 3 раза в сутки; детям 6-14 лет — по 200 мг нифуроксазида (5 мл суспензии) 4 раза в сутки; 2 группа (группа сравнения) — 60 детей, получавшие в качестве этиотропной терапии Цефалоспорины 3 поколения (цефтриаксон, в дозировке 50 мг/кг/сутки или цефиксим в дозировке 8 мг/кг для детей до 12 лет, для детей старше 12 лет массой тела более 50 кг — 400 мг/сутки (1 раз в сутки или по 200 мг 2 раза в сутки). Для решения поставленных задач мы изучали анамнез и течение данного заболевания. Эффективность лечения ОКИ у детей оценивали по длительности госпитализации пациента, продолжительности симптомов интоксикации, срокам купирования лихорадки, рвоты и диареи, болей в животе, метеоризма, отсутствию болезненности по ходу толстого кишечника, срокам нормализации аппетита и других проявлений, которые отражали эффективность терапии назначаемыми препаратами. Критерии эффективности применения вышеуказанных антибактериальных препаратов, были следующими: «хорошая» — нормализация клинических параметров к третьим суткам от старта терапии; «удовлетворительная» — купирование клинической симптоматики к 4-5 суткам от старта терапии; «отсутствие эффекта» — терапия неэффективна с и/или увеличением интенсивности симптомов заболевания, повлекшее за собой смену антибиотика. Ежедневно оценивали соматический статус ребенка, включая его психоэмоциональное состояние. Кроме того, оценивали переносимость препаратов и отсутствие нежелательных реакций (в том числе аллергических), включая приверженность (комплаентность) к терапии пациентов. Тщательно собирались жалобы, изучался анамнез заболевания, включая эпиданамнез, длительность болезни на амбулаторном этапе и проводимую терапию до госпитализации в стационар. **На всех этапах** проводили рутинные клинические исследования: общий и биохимический анализы крови и мочи, КЩС, анализ кала на группу простейших, анализ кала на яйца гельминтов, копрограмму, а также с целью определения этиологии ОКИ перед началом антибактериальной терапии всем детям методом ПЦР в фекалиях определяли ДНК/РНК аденовирусов группы F, ротавирусов группы A, норовирусов 2-го генотипа, астровирусов, а также микроорганизмов рода *Shigella*, энтероинвазивных *E. coli*, *Salmonella*. Осуществляли определение ротавирусных антигенов в фекалиях методом ИФА, бактериологическое исследование фекалий,

серологическое исследование крови в РПГА с сальмонеллезными, шигеллезными и иерсиниозными диагностикумами.

На третьем этапе проведено проспективное, одномоментное, не рандомизированное исследование с формированием двух независимых выборок. Набор материала проводился на базе ИКБ №2 Департамента здравоохранения г. Москвы (главный врач — Краснова С.В.) с 2018 года по 2020 год. Критерии включения пациентов в исследование: 1. Для детей с ОКИ, требующих стационарного лечения (основная группа): дети от 6 мес. до 14 лет, установленный диагноз ОКИ, госпитализация в первые четверо суток с момента болезни, длительность стационарного пребывания составляет трое суток и больше, подписанное информированное согласие родителей/законных представителей на участие в исследовании. 2. Для здоровых детей (группа сравнения): клинически здоровые дети, подписанное информированное согласие родителей/законных представителей на участие в исследовании; критерии не включения пациентов в исследование: сопутствующая хроническая инфекционная патология (вирусные гепатиты, ВИЧ-инфекция и др.), тяжелая сопутствующая патология (пороки развития, ДЦП, сахарный диабет, сердечная недостаточность и др.), отсутствие подписанного информированного согласия родителей на участие в исследовании

Нами было проведено обследование 124 детей, из них 84 больных ОКИ детей и 40 условно здоровых детей из группы контроля, обоюго пола в возрасте от 6 месяцев до 14 лет, госпитализированные в первые три дня от начала заболевания с симптомами, типичными для острого гастроэнттероколита/энтероколита. При первичном осмотре всех пациентов тщательно осуществлялся сбор анамнеза, объективный осмотр с оценкой симптомов ОКИ. В зависимости от назначаемой терапии антибиотиками детей распределили в три группы: 1 группа — 48 детей получали Нифуроксазид (17 мальчиков — 35% и 31 девочка — 65%), в возрастной дозировке: детям от 6 мес. до 3 лет — 100 мг нифуроксазида (2,5 мл суспензии) 3 раза в сутки; детям 3-6 лет — по 200 мг нифуроксазида (5 мл суспензии) 3 раза в сутки; детям 6-14 лет — по 100 мг нифуроксазида (5 мл суспензии) 4 раза в сутки; 2 группа — 36 детей, получали Цефалоспорины 3 поколения (цефтриаксон, в дозировке 50 мг/кг/сутки, или цефотаксим, в дозировке 100 мг/кг/сутки); 3 группа (группа контроля) — 40 условно здоровых детей. Все законные представители пациентов были проинформированы о деталях исследования и подписали документ, подтверждающий их добровольное согласие на участие в исследовании. При первичном осмотре тщательно собирались жалобы, анамнез заболевания, обращали внимание на эпиданамнез, время начала болезни до поступления в стационар, а также проводимую терапию и терапию сорбентами. Проводился клинический осмотр с оценкой физического развития по программному калькулятору Auhology.

Исследование состава микробиоты кишечника проводили с использованием 16S рРНК секвенирования. Для этих целей до начала антибактериальной терапии и на пятый-седьмой день проводимой терапии антибиотиками проводили забор фекалий. В первой группе (получавших нифуроксазид) также проводили забор фекалий через двадцать три-двадцать пять дней после окончания приема антибиотиков. ДНК-анализ микробиоты. Выделение ДНК из образцов фекалий производилось с помощью наборов QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen). Концентрация ДНК измерялась с помощью Qubit dsDNA HS assay на приборе Qubit 2.0 (ThermoFisher Scientific). После амплификации фрагмента V3-V4 прокариотического гена 16S рРНК и подготовки библиотек было проведено высокопроизводительное секвенирование на пробирках Illumina MiSeq. Для анализа были использованы одиночные риды R1, обрезанные с 3, -конца до среднеминимальной по партиям длины, составляющей 250 нуклеотидов. Данный анализ проводился на базе лаборатории «Атлас» (заведующий лабораторией — Карасев А.В.).

Анализ данных по составу микробиоты был проведен с помощью платформы Кномикс-Биота (<https://biota.knomics.ru/>). Первичные данные секвенирования (риды) были предобработаны с использованием программного пакета QIIME2. К ридам был применен

алгоритм DADA2 для очистки от шумоподобных прочтений и получения представленности уникальных представительных последовательностей с точностью до 1 нуклеотида. После классификации все образцы были прорежены до 3000 ридов. Таблицы относительной представленности на уровне семейства были получены путем суммирования представленности последовательностей, принадлежавших соответствующему семейству. Дополнительный анализ данных был проведен с помощью языка R. Для того, чтобы оценить изменения в микробиоме, ассоциированные с заболеванием и терапией, была проанализирована относительная представленность семейств бактерий-оппортунистов как в отдельности, так и суммарно — эти величины характеризуют степень отклонения состава микробиоты от наблюдаемого у здоровых детей. Для каждого образца было оценено разнообразие микробного сообщества (альфа-разнообразие) с помощью индекса Шеннона. Данный индекс тем выше, чем более равномерно представлены уникальные последовательности нуклеотидов в сообществе. После первичной предобработки ридов глубина покрытия составила в среднем 235 (от 52 до 360) тыс. ридов на образец. После фильтрации по качеству, удаления шумовых последовательностей с помощью DADA2 и картирования на базу GreenGenes осталось в среднем 27 (от 7 до 60) тыс. ридов на образец. Чтобы избежать влияния естественной вариабельности глубины секвенирования на результаты анализа, риды были случайным образом прорежены до 3 тысяч на образец. Всего по совокупности образцов была детектирована 1731 уникальная последовательность. После суммирования ридов, принадлежащих одинаковым таксонам, было детектировано 26 отделов бактерий, в их числе 337 видов, 290 родов, 172 семейств, 102 порядка и 59 классов. На четвертом этапе проведено проспективное, одномоментное, не рандомизированное исследование с формированием двух независимых выборок. Исследование проводилось на базе детского инфекционного отделения Химкинской Центральной Клинической Больницы (заведующий отделением — Барыкин В.И.) в период с 2021 года по 2023 год.

Нами было проведено обследование 30 детей (1-14 лет), из них 24 ребенка с *C. difficile*-ассоциированной диареей и 6 условно здоровых детей из группы контроля. Дети были госпитализированы в первые три дня болезни. Детям был установлен диагноз Энтероколит, вызванный *Clostridium difficile*. Дети были распределены на три группы: 1 группа — 12 детей (6 мальчиков — 50% и 6 девочек — 50%), получавшие в качестве этиотропной терапии антибактериальный препарат — цефалоспорин III поколения в сочетании с *Saccharomyces boulardii*; 2 группа — 12 детей (6 мальчиков — 50% и 6 девочек — 50%), получавшие в качестве этиотропной терапии антибактериальный препарат — цефалоспорин III поколения без *Saccharomyces boulardii*; 3 группа (группа контроля) — 6 условно здоровых детей (3 мальчика и 3 девочки), не получавшие антибиотиков последние три месяца. При первичном осмотре у родителей всех пациентов тщательно собирались анамнез заболевания, жалобы, также обращали внимание на проводимую на догоспитальном этапе антибактериальную терапию. Проводился клинический осмотр с оценкой физического развития по программному калькулятору Auhology.. Стул оценивали по Бристольской шкале до и после начала антибактериальной терапии.

Учитывали наличие кратности диареи, абдоминального болевого синдрома, примесей слизи и/или гноя в стуле. На данном этапе исследования иммунохроматографическим экспресс-тестом определяли токсины А и В *Clostridium difficile* в кале. У каждого пациента были собраны образцы фекальной микробиоты до назначения антибиотика и при выписке. У здоровых детей образцы были собраны однократно при первичном осмотре. Образцы фекальной микробиоты были собраны с использованием специальных стерильных пробирок и реагента для транспортировки и хранения клинического материала «Транспортная среда с муколитиком» (ТСМ). Для стандартизации протокола взятия микробиоты забор производили специально обученные сотрудники. Температура для хранения и транспортировки образцов фекальной микробиоты составляла -20°C. Выделение ДНК из фекальных образцов с использованием

наборов для выделения ДНК со стадией гомогенизации образцов твердотельными микрочастицами и делеции ингибиторов (Nobias Technologies, Россия). Оценка количества копий гена 16S в растворе выделенной ДНК проводилась с использованием наборов для контроля качества преаналитического этапа метагеномных исследований (Nobias Technologies, Россия). Для амплификации полноразмерного гена 16S рРНК были использованы праймеры 27F и 149R (AGAGTTGATYMTGGCTCAG и GGTТАССТTGTTAYGACTT) и амплификатор CFX 96 (Bio-Rad, США). С использованием магнитных частиц Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter Inc) проводилась очистка полученных ПЦР-продуктов. С помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле оценивали качество полученных ампликонов. Дальнейшая подготовка библиотек ампликонов и секвенирование осуществляли с использованием реактивов фирмы NEB: репарации одноцепочечных разрывов и концов НК «NEBNext FFPE Repair Mix» (M6630), «NEBNext End repair/dA-tailing Module» (E7546) и лигирование адаптеров «NEBNext Quick Ligation Module» (E6056). Все ферментативные зависимые (промежуточные) стадии приготовления библиотеки сопровождалась необходимой очисткой образца при помощи магнитных частиц Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter Inc). Концентрация полученных библиотек 16S рРНК в растворе измеряли с помощью флуориметра Qubit (Invitrogen, США) с использованием набора для высокочувствительного анализа dsDNA Quant-iT™ (Thermo Fisher Scientific). Очищенные библиотеки смешивали эквимолярно в соответствии с оцененными концентрациями. Секвенирование проводили с использованием наборов от производителя Oxford Nanopore Technologies: Legation Sequencing Kit (SQK-LSK109), Flow Cell Priming Kit (EXP-FLP002) и набора для PCR-free мультиплексирования Native Barcoding Expansion 96 (EXP-NBD196). Исследование проведено в лаборатории «КНОМИКС» (заведующий лабораторией — Кошечкин С.И.).

Методы статистической обработки полученных результатов

Анализ данных и математическая обработка результатов исследования проводились с помощью персонального компьютера с использованием пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc, США) и Microsoft Office Excel 2016.

Методы описательной статистики с основными критериями (среднее арифметическое при нормальном распределении, медиана, стандартное отклонение (дисперсия)). С целью установления статистической значимости измеряемой величины и различий между двумя величинами применяли параметрический метод проверки гипотезы с использованием t-критерия Стьюдента при нормальном распределении, при условии равенства дисперсий и с помощью U-критерия Манна-Уитни, если распределение отличалось от нормального. Таблицу квантелей распределения использовали в случаях с небольшой выборкой для построения доверительного интервала. Доверительные коэффициенты рассчитывали сегрегированно по типу и результату статистического наблюдения. Статистически значимым считали измерения между показателями при уровне вероятности $p < 0,05$. В среде программирования R проводили статистический анализ данных 16S рРНК секвенирования генома. При проверке гипотез использовался порог значимости 0,05. Поправка на множественное сравнение делалась с помощью метода Бенджамини-Хохберга. Р значения округлены до 3-го знака после запятой. Для анализа альфа-разнообразия использовались непараметрические методы: критерий Манна-Уитни, критерий Вилкоксона и квантильная регрессия для регрессионного анализа. Точный критерий Фишера — для анализа категориальных данных, а для несвязанных выборок критерий Мак Немара. Для оценки значимости ассоциации β -разнообразия с различными факторами использовался метод PERMANOVA. При анализе изменений у участников учитывалась парность образцов. Ассоциацию пропорций микроорганизмов с различными факторами проверяли с помощью PERMANOVA для расстояния Эйтчисона. При анализе

изменений у участников учитывалась парность образцов и возраст участников, при сравнении изменений — возраст участников на первом визите.



Рисунок 1. Дизайн исследования [разработан автором]

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ ОКИ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ

1.1. Спектр применения в клинической практике антибактериальных препаратов различных групп в терапии бактериальных ОКИ.

Проведен анализ стартовой АБ терапии у 674 детей, больных бактериальными ОКИ, которые протекали с сочетанным поражением верхних и нижних отделов ЖКТ, или изолированно, с поражением только нижних отделов ЖКТ. Гастроэнтероколит зафиксирован у 391 (58%), энтероколит – у 195 (28,9%), гемоколит – у 88(13,1%). В структуре лекарственных препаратов, применяемых для лечения бактериальных ОКИ, во всех возрастных группах преобладал Нифуроксазид. Данный препарат был назначен 241 (36%) больным, цефалоспорины 3 поколения получали – 139 (21%), нифурател - 35 (5%), а аминогликозиды и макролиды суммарно - 29 (5%). Следует отметить, что – 224 (33%) больных, с легкой формой, антибактериальную терапию не получали. Данные представлены на рисунке 2.

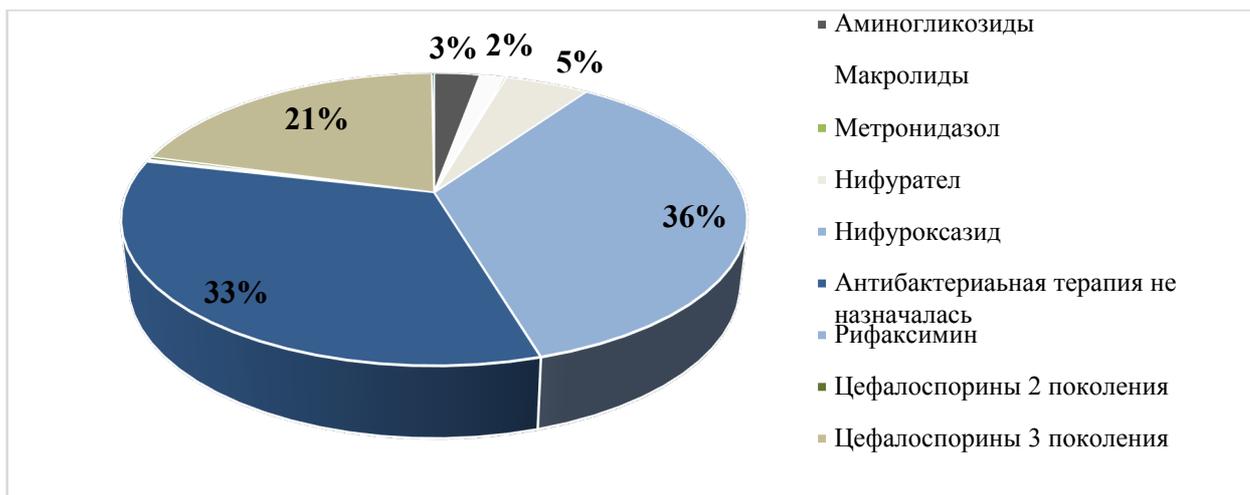


Рисунок 2. Структура лекарственных препаратов, применяемых для лечения бактериальных ОКИ на современном этапе (n=674).

1.2. Сравнительная оценка клиническо-лабораторной эффективности нифуроксазида и препаратов группы цефалоспоринов III поколения.

Учитывая доминирование в структуре стартовых АБ препаратов Нифуроксазида и Цефалоспоринов III поколения нами проведена сравнительная оценка их клинико-лабораторной эффективности. Сравнимые группы были вполне сопоставимы по частоте сопутствующих заболеваний и преморбидному фону. Больные были равномерно распределены во всех возрастных группах. У всех детей основной и группы сравнения ОКИ протекала по инвазивному типу, в среднетяжелой форме. Этиотропная терапия была начата в первые два дня от начала заболевания (80 и 76,6%). Таким образом, данные группы сопоставимы по возрасту, тяжести и клиническому варианту болезни (Таблица 1).

Таблица 1. Общая характеристика исследуемых групп больных

| Параметры | Основная группа, n=60 | | Группа сравнения, n=60 | | p |
|--|-----------------------|------|------------------------|------|--------|
| | Абс. | % | Абс. | % | |
| Возраст: | | | | | |
| 0-3 года | 14 | 23,3 | 18 | 30 | P>0,05 |
| 4-6 лет | 22 | 36,7 | 16 | 26,7 | P>0,05 |
| 7-14 лет | 24 | 40 | 26 | 43,3 | P>0,05 |
| Клинические формы: | | | | | |
| Гастроэнтероколит | 26 | 43,3 | 22 | 36,7 | P>0,05 |
| Энтероколит | 28 | 46,7 | 30 | 50 | P>0,05 |
| Гемоколит | 6 | 10 | 8 | 13,3 | P>0,05 |
| Тяжесть течения: | | | | | |
| Среднетяжелая | 60 | 100 | 60 | 100 | P>0,05 |
| Сроки госпитализации от начала заболевания | | | | | |
| 1 сутки | 22 | 36,7 | 26 | 43,3 | P>0,05 |
| 2 сутки | 26 | 43,3 | 20 | 33,3 | P>0,05 |
| 3 сутки | 6 | 10 | 6 | 10 | P>0,05 |
| >4 суток | 6 | 10 | 8 | 13,3 | P>0,05 |

Достоверная разница средних, $p < 0,05$ (критерий достоверности – χ^2)

Проанализированы динамика купирования и средняя продолжительность симптомов интоксикации и гастроинтестинальных симптомов. (Рисунок 3).

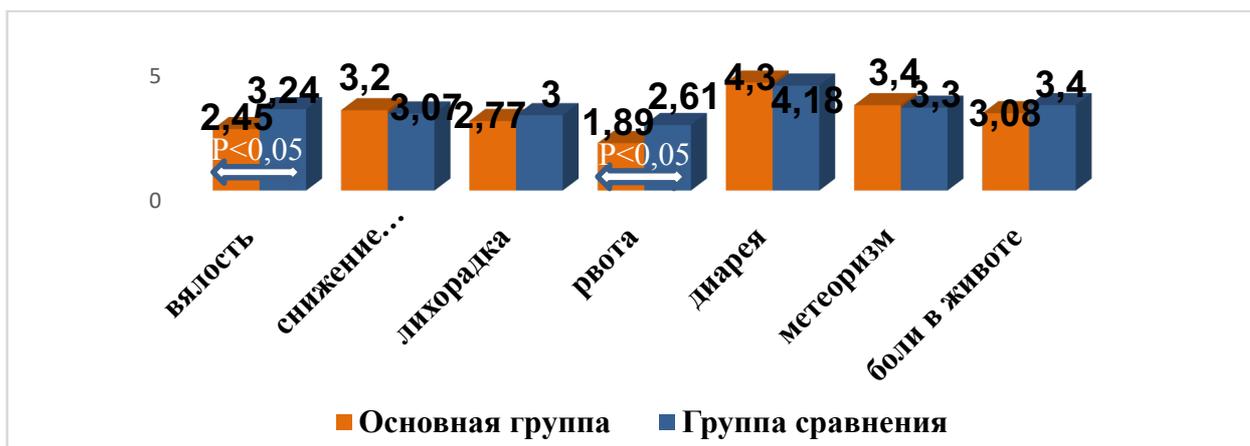


Рисунок 3. Продолжительность основных симптомов ОКИ в исследуемых группах

У детей основной группы продолжительность вялости составила $2,45 \pm 0,73$ (по сравнению с $3,24 \pm 0,84$ суток во второй группе, $p=0,001$); аппетит нормализовался на вторые сутки у 53,3% детей, на третьи сутки — у 93,3% больных, в отличие от группы сравнения, в которой нормализация аппетита происходила в более длительные сроки и у меньшего количества детей — 33,3% и 53,3% ($p=0,001$ критерий Фишера) соответственно. Лихорадочный период в среднем не различался в двух группах. Оценивая динамику длительности симптомов дисфункции ЖКТ (диарея, метеоризм, боли в животе), статистически значимых различий между группами обнаружено не было: длительность диареи составила $4,3 \pm 0,85$ и $4,18 \pm 1,2$ суток соответственно; длительность болей в животе при пальпации — $3,08 \pm 0,64$ и $3,4 \pm 0,8$ суток соответственно, $p=0,121$ критерий Стьюдента.

Оценивая динамику лабораторных показателей (лейкоцитоз, увеличение СОЭ, нейтрофильный п/я сдвиг), было выявлено, что у всех пациентов как основной группы, так и группы сравнения, отмечался нейтрофильный палочкоядерный сдвиг влево (64% и 73% соответственно), лейкоцитоз (25% и 21%), увеличение СОЭ у (11% и 6%) детей. Однако при оценке общего анализа крови через 7 дней нормализация данных лабораторных показателей отмечена у 78% и 67% пациентов соответственно (Рисунок 4).

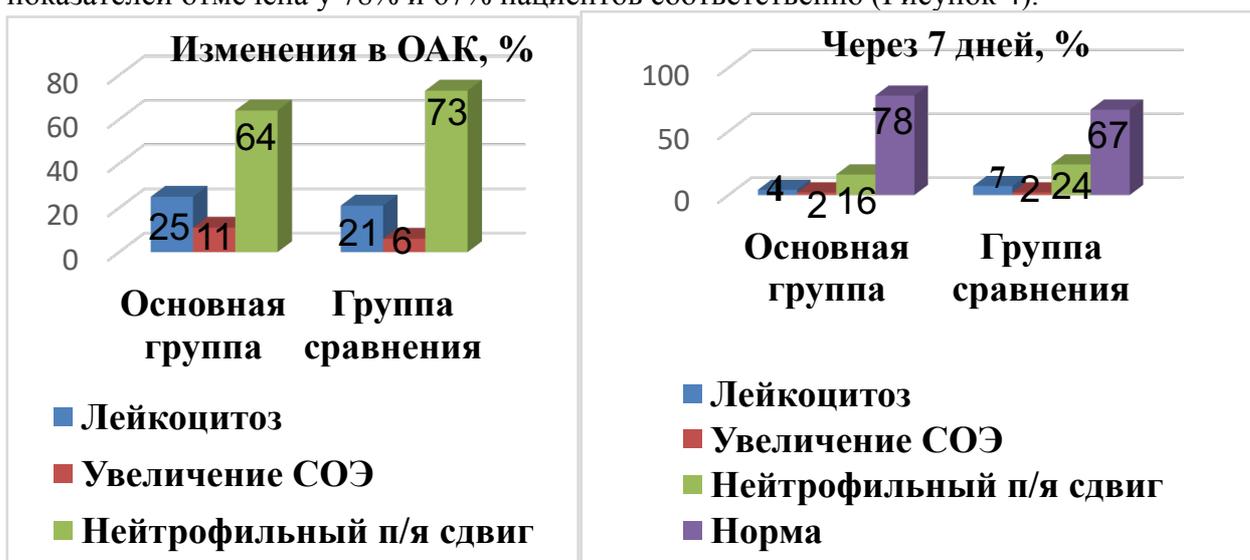


Рисунок 4. Динамика изменений ОАК у детей с бактериальными ОКИ

Нами были оценены копрологические синдромы у детей на момент поступления и через 7 дней после начала этиотропной терапии, оценивались следующие копрологические

синдромы: гастритический, панкреатический, энтеральный, илеоцекальный, колидистальный (Рисунок 5).

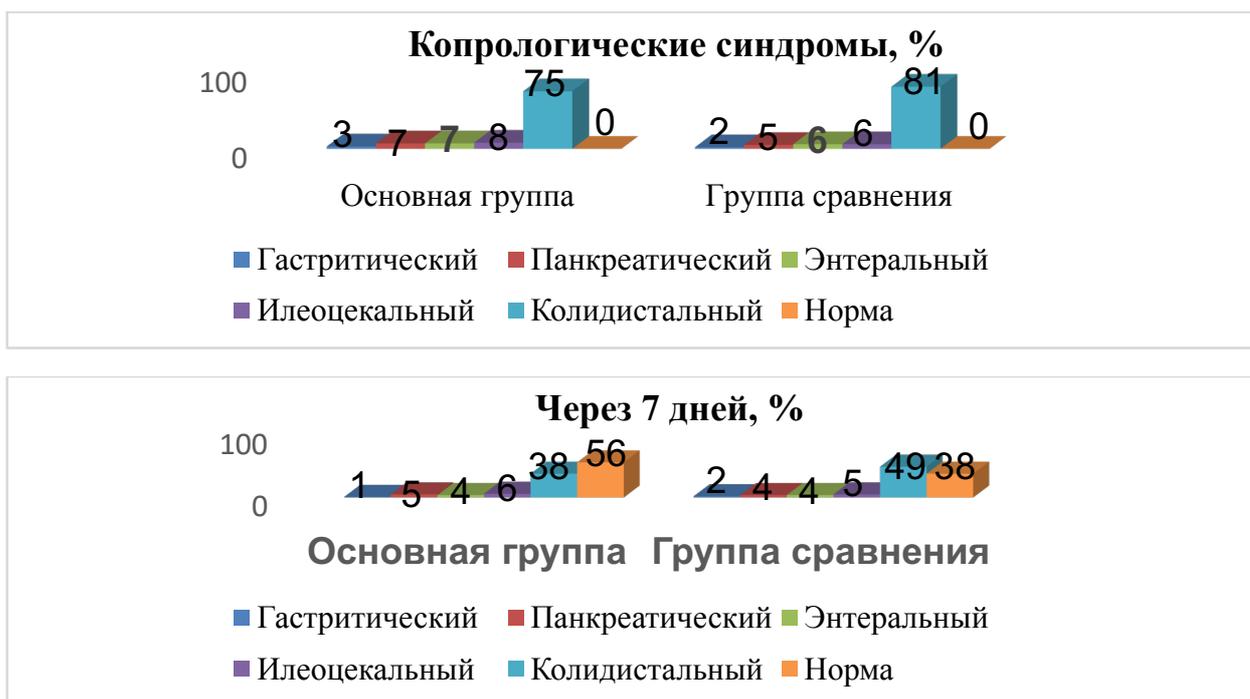


Рисунок 5. Динамика копрологических синдромов у детей с бактериальными ОКИ

Зафиксировано, что ведущим копрологическим синдромом при поступлении был колидистальный (75% и 81%). При оценке копрологических синдромов в динамике через 7 дней вариант нормы отмечен у 56% и 38% детей.

Комплексная оценка эффективности терапии позволила установить у 68,7% детей основной группы и у 71,2% группы сравнения хороший терапевтический эффект, а у 31,3% детей основной группы и у 28,8% детей группы сравнения как удовлетворительный, замены антибактериального препарата не потребовалось, что было признано как отсутствие неудовлетворительного эффекта от лечения. Важно отметить, что при сопоставимом клиническом эффекте с цефалоспоринами, при применении нифуроксазида выявлено более быстрое купирование рвоты и восстановление активности.

2. ОЦЕНКА ДИНАМИКИ ИЗМЕНЕНИЙ МИКРОБИОМА КИШЕЧНИКА НА ФОНЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ ОКИ

2.1 Этиологическая структура ОКИ у детей

Этиологическая структура бактериальных ОКИ в подгруппе детей, получавшей нифуроксазид, была следующей: сальмонеллез был верифицирован у 16 (33%), в комбинациях с рота- и норовирусами у 12 (25%) детей, шигеллез у 8 (17%), и у 12 (25%) детей идентифицировать возбудитель не удалось. Этиологическая структура бактериальных ОКИ в подгруппе детей, получавшей цефалоспорины 3 поколения: сальмонеллез был верифицирован у 16 (44%), в комбинациях с рота- и норовирусами у 8 (22%) детей, шигеллез у 8 (22%), и у 4 (12%) детей идентифицировать возбудитель не удалось. По преморбидному фону и сопутствующим заболеваниям сравниваемые группы были вполне сопоставимы.

2.2. Динамика клинических симптомов бактериальных ОКИ в зависимости от проводимой терапии

Все пациенты на момент включения в исследование имели клинические проявления, характерные для бактериальной ОКИ, в том числе «колитный» стул выявлен у 100%

пациентов, примеси слизи и крови в стуле (гемоколит у 42 и 33% детей), в сочетании с другими симптомами, типичными для ОКИ. Исходная частота стула составила $5,9 \pm 2,4$ эпизодов в сутки в подгруппе детей, получавших нифуроксазид, и $6,7 \pm 1,9$ в подгруппе детей, получавших цефалоспорины. Продолжительность основных клинических симптомов (Таблица 2).

Таблица 2. Длительность основных клинических симптомов ОКИ в группах сравнения после начала антибактериальной терапии (в сутках)

| Длительность основных клинических симптомов острой кишечной инфекции в группах сравнения после начала антибактериальной терапии (в сутках) | | | | | | | | | | |
|---|--------------------------------------|------|-----|------|-----|--|------|-----|------|------|
| Параметры сравнения | Дети, получавшие нифуроксазид (n=48) | | | | | Дети, получавшие препарат группы цефалоспоринов (n=36) | | | | |
| | m | sd | med | max | min | m | sd | med | max | min |
| Температура выше 37,0 С° | 6,0 | 6,8 | 4,8 | 16,0 | 0,0 | 12,0 | 13,6 | 3,6 | 20,0 | 8,0 |
| Рвота | 4,0 | 3,2 | 2,4 | 8,0 | 0,0 | 8,0 | 8,8 | 4,0 | 20,0 | 0,0 |
| Диарея | 12,0 | 14,4 | 4,4 | 16,0 | 8,0 | 20,0 | 20,8 | 5,6 | 32,0 | 8,0 |
| Интоксикация | 6,0 | 7,2 | 3,2 | 12,0 | 4,0 | 16,0 | 18,4 | 7,6 | 36,0 | 8,0 |
| Экзикоз | 4,0 | 4,0 | 0,8 | 8,0 | 0,0 | 8,0 | 7,6 | 2,4 | 12,0 | 4,0 |
| Боли в животе | 12,0 | 12,0 | 4,8 | 16,0 | 0,0 | 16,0 | 16,8 | 2,8 | 20,0 | 12,0 |

m - среднее, sd - стандартное отклонение, med - медиана, max - максимальное значение, min - минимальное значение.

2.3. Состояние микробиоты кишечника у детей с бактериальными ОКИ

Альфа-разнообразие микробиоты больных ОКИ (подгруппа получавшая нифуроксазид) до начала лечения было статистически значимо снижено по сравнению со здоровыми детьми из группы контроля ($p = 0,0036$). Такое снижение на фоне кишечной инфекции может быть связано как с увеличением представленности отдельных бактериальных таксонов, так и со снижением уровня некоторых таксонов вследствие диареи, воспалительных процессов и изменениями питания. Для того, чтобы оценить вклад увеличения доли бактерий-оппортунистов в снижение альфа-разнообразия, был проведен анализ представленности каждого из отдельных бактериальных условно патогенных семейств: Enterobacteriaceae, Enterococcaceae, Veillonellaceae, Aeromonadaceae, Streptococcaceae, Moraxellaceae, Fusobacteriaceae (Рисунок 6).



Рисунок 6. Микробиота кишечника больных ОКИ до лечения и у здоровых детей на уровне семейства.

Представленность Fusobacteriaceae была значимо выше у больных ОКИ ($p = 0,0354$). Данный род не детектировался ни у одного из здоровых детей, но наблюдался у 12 пациентов из основной группы до лечения. Представленность других семейств между основной группой и группой контроля статистически значимо не различалась. Однако

анализ наиболее часто выявленных бактериальных семейств в каждом образце показал, что имеет место спорадически высокие значения отдельных редких оппортунистических семейств. Это говорит о разнообразном характере нарушений баланса микробиоты кишечника, потенциально ассоциированного с ОКИ у детей. Было обнаружено, что отношение доли условно патогенных семейств к доле комменсальных микроорганизмов было значимо снижено у детей больных ОКИ ($36,8 \pm 1,38$ у детей с ОКИ, $0,96 \pm 0,84$ у здоровых детей, односторонний тест Вилкоксона, $p = 0,0361$) (Рисунок 7).

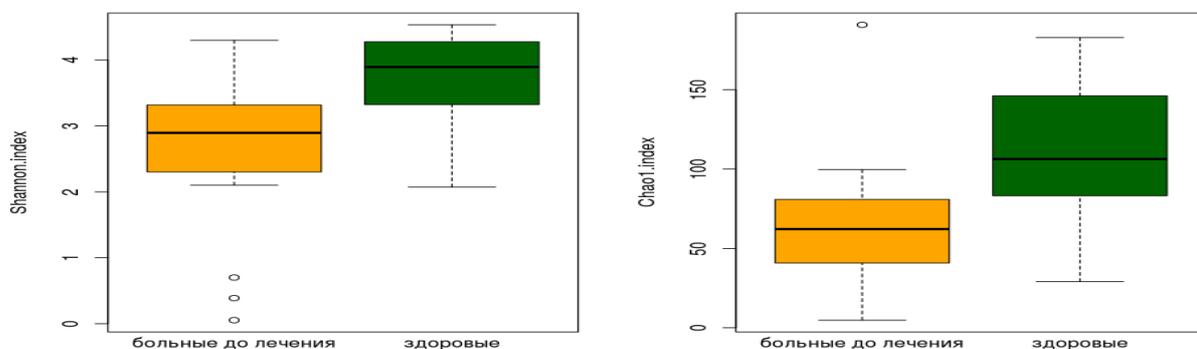


Рисунок 7. Видовое разнообразие микробиоты кишечника в дебюте ОКИ и у здоровых детей.

В дебюте инвазивных ОКИ значительно возростала доля условно патогенных семейств, таких как: Enterobacteriaceae, Enterococcaceae, Bacteroidaceae изменение их соотношения к доле комменсальных микроорганизмов Ruminococcaceae и Veillonellaceae.

2.4. Изменение микробиоты, ассоциированные с приемом нифуроксазида.

Индекс Шеннона пациентов группы, получавшей нифуроксазид, был значимо ниже значений, характерных для группы здоровых детей ($p = 0,0044$). На фоне приема нифуроксазида его значение выросло ($p = 0,0024$) и перестало статистически значимо отличаться от альфа-разнообразия участников контрольной группы ($p = 0,1593$). Так же, как и в основной группе до начала лечения, в подгруппе, принимавшей нифуроксазид, наблюдалось повышение доли семейства Fusobacteriaceae относительно представленности микроорганизма в микробиоте детей группы контроля ($p = 0,0139$, критерий Манна-Уитни). Как сразу после, так и через один месяц после окончания лечения значимых отличий в представленности микроорганизма между основной группой и группой контроля не было выявлено ($p > 0,05$). На фоне терапии нифуроксазидом возростало и восстанавливалось разнообразие видов микроорганизмов (альфа-разнообразие) уже к моменту завершения курса антибиотикотерапии (рисунок 8).

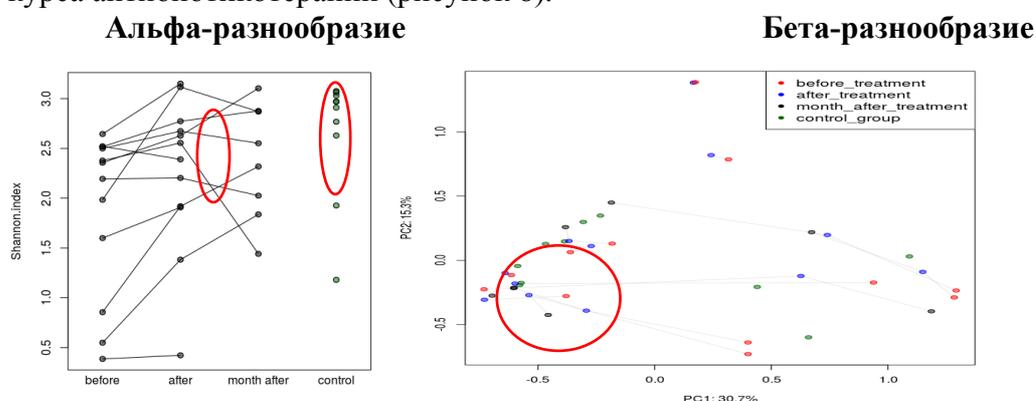


Рисунок 8. Динамика видового разнообразия микробиоты на фоне терапии нифуроксазидом бактериальных ОКИ.

2.5. Изменение микробиоты, ассоциированные с приемом цефалоспоринов.

Альфа-разнообразие микробиоты кишечника детей из подгруппы, получавшей цефалоспорины, до начала лечения было снижено по сравнению с показателем у здоровых детей ($p = 0,0014$). В отличие от подгруппы, получавшей нифуроксазид, разнообразие микробиоты у этой подгруппы не восстанавливалось за время лечения: статистически значимых изменений после лечения не выявлено ($p = 0,25$), значимое снижение по сравнению со здоровыми детьми из группы контроля сохранилось ($p = 0,0117$). При приеме цефалоспоринов выявлено значимое уменьшение Enterobacteriaceae ($p = 0,0488$). Доля условных патогенов по отношению ко всем остальным таксонам была статистически значимо выше у больных детей до начала лечения в сравнении с аналогичным показателем у здоровых детей ($p = 0,0488$). Однако, она снизилась в ходе лечения до значений, характерных для здоровых детей ($p = 0,0273$). К моменту окончания терапии цефалоспоринами разнообразие видов микроорганизмов (альфа-разнообразие) значимо не изменялось, сохранялись исходно выявленные нарушения, а именно, повышенная доля условно патогенных видов и низкий уровень комменсалов (рисунок 9).

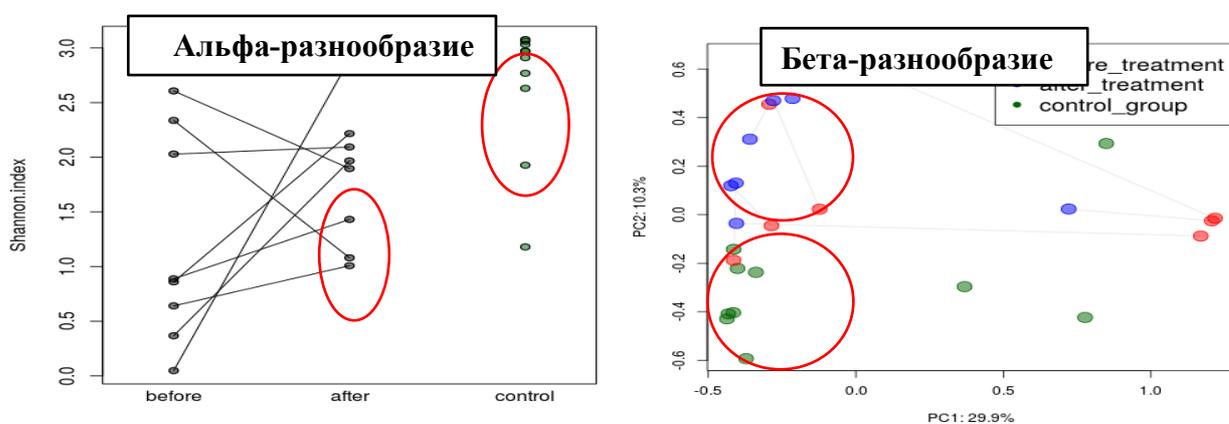


Рисунок 9. Динамика видового разнообразия микробиоты на фоне терапии цефалоспоринами бактериальных ОКИ.

Итак, на фоне терапии нифуроксазидом бактериальных ОКИ возрастало и восстанавливалось разнообразие видов микроорганизмов (альфа-разнообразие) уже к моменту завершения курса антибиотикотерапии. При применении цефалоспоринов III поколения в лечении ОКИ бактериальной и вирусно-бактериальной этиологии сохранялись исходно выявленные нарушения – повышенная доля условно патогенных видов и низкий уровень комменсалов (*Bifidobacterium*, *Coprococcus*, *Christensenellaceae*), а также возрастал метаболический потенциал устойчивости к антибиотикам бета-лактамного ряда. Таким образом, у нифуроксазида выявлен биоценозсберегающий потенциал.

3. СОСТОЯНИЕ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА У ДЕТЕЙ С *Cl. DIFFICILE* – АССОЦИИРОВАННОЙ ДИАРЕЕЙ ЛЕГКОЙ ФОРМЫ НА ФОНЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Изменение характера стула в зависимости от получаемой пациентом терапии

Большая часть участников исследования на момент поступления в стационар к началу АБ-терапии имела нормальную консистенцию стула - 10 (83,3%) из 12 участников, которые получали препарат из группы цефалоспоринов III поколения с пробиотиком (*S. boulardii*) и 9 (75%) из 12 участников, которые получали препарат из группы цефалоспоринов III поколения без *S. boulardii*. Анализ изменений консистенции стула проводился по Бристольской шкале. Изменение консистенции стула произошло у всех детей первой и второй подгрупп после начала антибактериальной терапии (Рисунок 10).

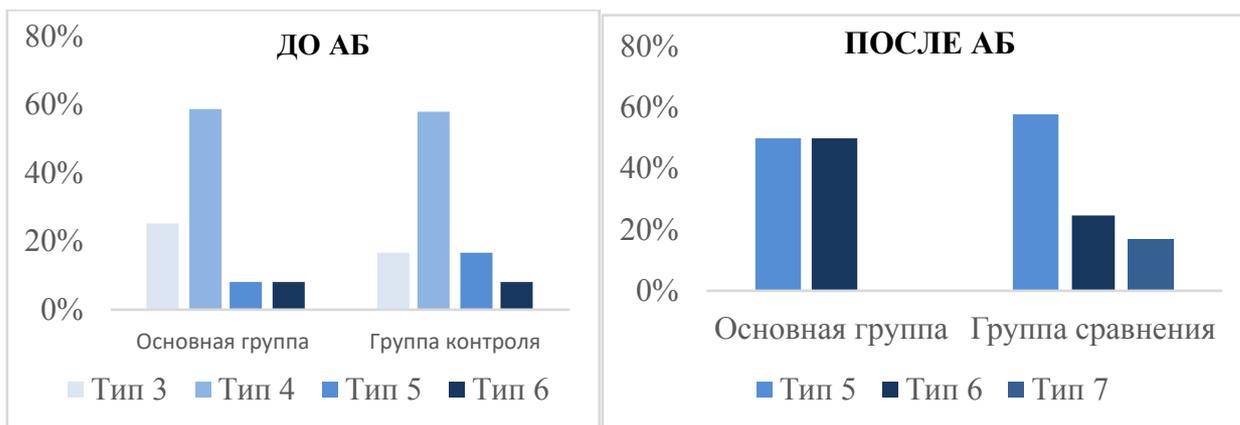


Рисунок 10. Оценка консистенции кала по Бристольской шкале до и после назначения антибактериальной терапии

У всех пациентов отмечалось учащение стула от 3 до 5 раз в сутки, так, у детей из первой подгруппы, получавшей цефалоспорины III поколения с *S. boulardii*, количество дефекаций составило 3 раза в сутки у 9 (75%) детей и 4 раза в сутки у 3 (25%) детей соответственно, а у детей, которые получали цефалоспорины III поколения без *S. boulardii*, стул был учащен до 5 раз в сутки. У детей, получавших пробиотический препарат, частота побочных эффектов от антибактериальной терапии, включая появление и учащение жидкого стула была достоверно реже, чем у пациентов, не получавших пробиотики. У всех участников исследования обнаружены токсины *Cl. difficile*.

Слизь в кале отмечалась у 6 (50%) детей из первой подгруппы и у 8 (67%) детей из второй подгруппы. В копрограмме лейкоциты ≥ 10 в поле зрения выявлены у 8 (67%) детей из первой подгруппы и у 10 (83%) детей из второй подгруппы.

3.1. Динамика клинических симптомов у детей с *C. difficile* – ассоциированной диареей

При изучении таких симптомов как: снижение аппетита, вздутие живота и боль в животе, вышеизложенные симптомы отмечались реже у детей из первой подгруппы, которые получали терапию цефалоспорином III с *S. boulardii* (Рисунок 11).



Рисунок 11. Частота возникновения различных кишечных симптомов.

3.2. Характеристика микробиоты детей при *Cl. difficile* – ассоциированной диарее

До назначения антибактериальной терапии, количество микробов в образцах стула здоровых и у больных детей существенно не отличалось. При сравнении образцов пациентов, собранных до начала лечения (без разделения на группы), и образцов здоровых детей по альфа-разнообразию, пропорциям микробов и бета-разнообразию Брея-Кертиса (Рисунок 12).

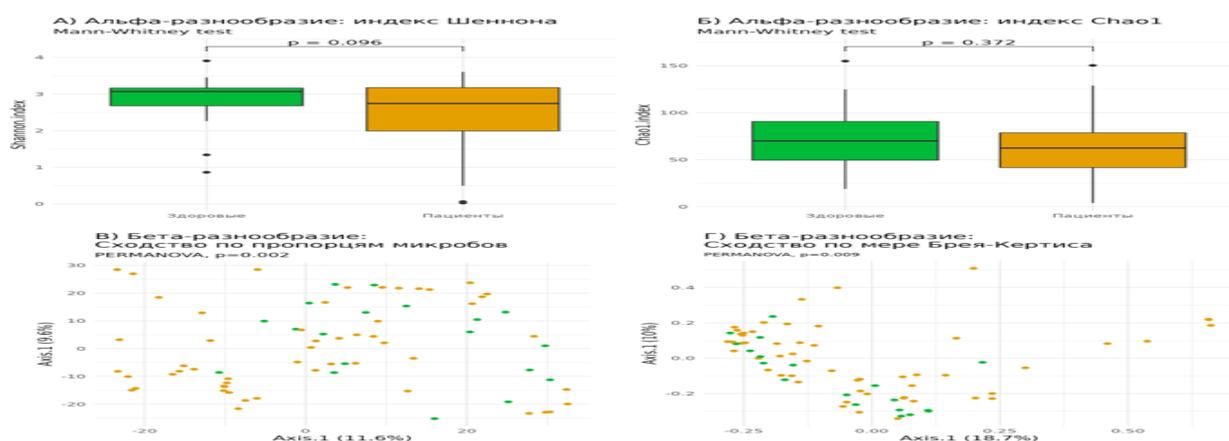


Рисунок 12. Сравнение микробиоты стула пациентов до лечения и здоровых детей по альфа-разнообразию и бета-разнообразию (желтый – пациенты, зеленый – здоровые).

Отличие наблюдалось лишь по расстоянию Эйтчисона, которое характеризует сходство пропорций основных микробов и по мере Брея-Кертиса, характеризующая сходство образцов по всем найденным микробам. Однако, статистически значимых отличий в альфа-разнообразии между больными и здоровыми получено не было (Таблица 3).

Таблица 3. Статистическая значимость различий микробиоты пациентов до лечения и здоровых детей.

| Показатель | Метод сравнения | Способ оценки показателя | р-значение (p<0,05) |
|--------------------------------|----------------------|--------------------------------|---------------------|
| Альфа-разнообразие | Критерий Манна-Уитни | Индекс Шеннона | 0,096 |
| | | Индекс Chao1 | 0,372 |
| Пропорции микробов | PERMANOVA | Расстояние Эйтчисона | 0,001 |
| Бета-разнообразие Брея-Кертиса | PERMANOVA | Бета-разнообразие Брея-Кертиса | 0,007 |

До начала лечения антибиотиками микробиота стула пациентов с осложненными ОРИ практически не отличалась от микробиоты здоровых детей по альфа-разнообразию и общему количеству микробов, но были выявлены различия по составу (пропорциям основных микробов, и бета-разнообразию Брея-Кертиса). К концу лечения альфа-разнообразию и количество микробов в образцах не поменялось ни в одной из групп. (Рисунок 13).

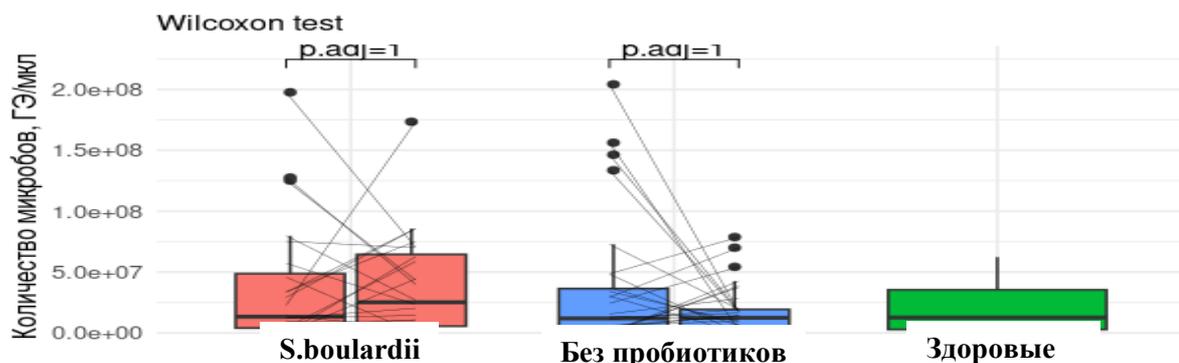


Рисунок 13. Изменение количества микробов в образцах кишечной микробиоты.

Несмотря на то, что при оценке динамики микробиоты нами не было выявлено значимых изменений в ее составе у пациентов, больных ОРВИ, *C.difficile* ассоциированной диареей, принимавших и не принимавших *S. boulardii*, однако, по клиническим проявлениям выявлен позитивный эффект именно у пациентов, которые его получали. Отсутствие значимого влияния на микробиом, вероятно, обусловлено достаточно коротким курсом (до 7 дней) назначения *Saccharomyces boulardii* и диктует необходимость продолжения исследования. Вместе с тем, прием *S. boulardii* положительно сказался на функциональном состоянии кишечника. Так, нами было зафиксировано, что у пациентов, принимавших *S. boulardii*, из наблюдаемой группы, чаще нормализовалась консистенция стула к концу госпитализации. Таким образом, назначение *S.boulardii* совместно с антибактериальной терапией с пациентов с осложненным течением ОРЗ является эффективным и безопасным для профилактики и лечения *Cl.difficile* - ассоциированной диареи.

Учитывая не всегда обоснованное, а зачастую бесконтрольное применение антибактериальной терапии, как в амбулаторных условиях, так и в условиях стационара, и отсутствие четкого алгоритма биоценозсберегающей терапии, на основании полученных нами данных, восполнен данный пробел (Рисунок 14).



Рисунок 14. Алгоритм биоценозсберегающей терапии бактериальных ОКИ у детей

Таким образом, мы рекомендуем включение в комплексную терапию легких и среднетяжелых форм бактериальных ОКИ у детей, в качестве стартовой терапии, пробиотика *S. boulardii* в возрастных дозировках, продолжительность курса лечения не менее 7 дней, в сочетании с нифуроксазидом/цефалоспорином по показаниям.

ВЫВОДЫ

1. В структуре лекарственных препаратов, используемых в стартовой этиотропной терапии бактериальных ОКИ у детей, наиболее часто как в условиях стационара, так и в амбулаторных условиях применяют нифуроксазид — 36%, цефалоспорины III поколения — 21%, антибиотики не назначались в 33%.

2. Назначение Нифуроксазида или Цефалоспоринов III поколения при бактериальных ОКИ демонстрирует сопоставимую клинико-лабораторную эффективность по купированию интоксикационного синдрома, функциональных нарушений ЖКТ, проявлений дегидратации. Применение Нифуроксазида, в отличие от Цефалоспоринов III поколения, не усугубляет дисбиотических нарушений, а по ряду показателей оказывает положительное воздействие на их стабилизацию.

3. Ключевыми звеньями патогенеза бактериальных ОКИ является дисбаланс иерархической структуры микробиоценоза, которые нивелируются при использовании в

терапии антимикробных препаратов, обладающих биоценозсберегающими свойствами и пробиотиков.

4. Основными проявлениями дисбиоза ЖКТ при бактериальных ОКИ, выявленном при оценке α и β -разнообразия, являются снижение доминирования бифидо- и лактобактерий и повышение значимости микроорганизмов, относящихся к малозначимым. Структура, степень изменения и длительность дисбаланса, помимо тяжести болезни и возраста пациента, определяются спектром применяемых антибактериальных препаратов.

5. Применение пробиотиков на фоне антибактериальной терапии бактериальных ОКИ протективно влияет на длительность и выраженность некоторых симптомов, а также частоту желудочно-кишечных расстройств, позволяет нивелировать негативное влияние на микобиом. Назначение *Saccharomyces boulardii* совместно с антибактериальной терапией для профилактики и лечения *Cl. difficile*-ассоциированной диареи является эффективным и безопасным.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Изменение таксономического состава микробиоты кишечника является значимым фактором в развитии и течении бактериальных ОКИ у детей, а также пациентов, получающих антибактериальную терапию. Внедрение метода секвенирования бактериальных генов 16S рРНК в рутинную клиническую практику позволит осуществлять дифференцированный и персонифицированный подход коррекции микробного пейзажа.

2. При ведении детей с бактериальными ОКИ легкой формы показан отказ от использования антибактериальных препаратов. Стартовая терапия должна предусматривать назначение моноштаммовых пробиотиков в возрастных дозировках курсом не менее 7 дней.

3. При ведении детей с бактериальной ОКИ среднетяжелой формы в амбулаторных и стационарных условиях рекомендовано в качестве стартовой противомикробной терапии использовать препараты нитрофуранового ряда (нифуросазид) в возрастных дозировках в сочетании с пробиотиком *S. boulardii*. При неэффективности стартовой терапии в качестве терапии использовать цефалоспорины III поколения в сочетании с пробиотиком *S. boulardii*.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Продолжение накопления фактических данных об изменении микробиоценоза при ОКИ различной этиологии с помощью молекулярно-генетических методов с целью совершенствования этиотропной и патогенетической терапии. Уточнение патогенеза внекишечных проявлений, обусловленных дисбиозом, оптимизация их диагностики, персонифицированной терапии.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

| | |
|--------------------------------------|--|
| АБП – антибактериальный препарат | КГ – контрольная группа |
| ГС – группа сравнения | МАНК – метод амплификации нуклеиновых кислот |
| ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота | ОГ – основная группа |
| ЖКТ – желудочно-кишечный тракт | ОКИ – острые кишечные инфекции |
| ИФА – иммуноферментный анализ | ОРИ – острые респираторные инфекции |
| ИН – интервенции нифуросазид | ПЦР – полимеразная цепная реакция |
| ИЦ – интервенции цефалоспорин | РПГА – реакция пассивной гемагглютинации |

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Николаева С.В., Тхакушинова Н.Х., Горелов А.В., **Крикун В.С.** Рациональная терапия моно- и сочетанных острых кишечных инфекций у детей // Эффективная фармакология. 2019. Т. 15. - №43. – С. 10-14. *
2. Усенко Д.В., Горелов А.В., Одинцова В.К., Каштанова Д.А., Кошечкин С.И., Тяхт А.В., **Крикун В.С.** Нарушение микробиоты кишечника в остром периоде инфекционной диареи у детей и сравнительная оценка влияния последующей терапии нифуроксазидом и препаратами группы цефалоспоринов // Инфекционные болезни. 2020. Т.18. - №3. С. 88-97.*
3. Горелов А.В., Усенко Д.В., Мелехина Е.В., Музыка А.Д., Дзотцоева Э.С., Кремлевская С.П., **Крикун В.С.** Влияние пробиотика *Saccharomyces boulardii* CN I-745 на развитие антибиотик-ассоциированного синдрома у детей, получающих системную антибактериальную терапию по поводу инфекций нижних дыхательных путей//Вопросы практической педиатрии. 2024. Т.19. - №2. С. 15-22. *
4. **Крикун В.С.**, Горелов А.В. Биоценозсберегающая терапия при инвазивных острых кишечных инфекциях // Научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Проблемы эпидемиологии, терапии и лабораторной диагностики инфекционных заболеваний. Москва, 2024. С. 42-43.
5. Горелов А.В., **Крикун В.С.** Практические рекомендации по терапии инвазивных острых кишечных инфекций у детей: учебное пособие для врачей. Москва, 2024. – 29 С.

*поименованы в перечне ВАК Министерства образования и науки РФ