

Е.В. Кулагина, З.А. Черная, А.Н. Шкопоров, Е.В. Хохлова, Б.А. Ефимов, Ю.М. Голубцова, Л.И. Кафарская

Российский национальный исследовательский медицинский университет РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва

# Оценка влияния смеси, обогащенной штаммом бифидобактерий BB12, на становление микрофлоры кишечника у новорожденных

## Contacts:

*Lyudmila Kafarskaya*, Doctor of Medical Science, professor, head of microbiology and virology chair of the Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov

**Address:** Ostrovityanov St., 1, Moscow, 117997, **Tel.:** (495) 434-17-66, **e-mail:** likmed@mail.ru

**Article received:** 16.05.2012, **Accepted for publication:** 03.08.2012

Работа посвящена изучению качественного и количественного состава нормальной микрофлоры кишечника у новорожденных до и после приема смеси «Агуша Gold 1», содержащей штамм *Bifidobacterium lactis* BB12. При помощи метода полимеразной цепной реакции в реальном времени детально изучен видовой состав кишечных бифидобактерий. Показано, что на фоне применения смеси наблюдается тенденция к формированию микробиоты и видового состава бифидобактерий кишечника, сходного с таковым при грудном вскармливании.

**Ключевые слова:** микрофлора кишечника, бифидобактерии, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.

## ВВЕДЕНИЕ

Микробная колонизация первоначально стерильного желудочно-кишечного тракта начинается с контакта новорожденного с микроорганизмами матери и окружающей среды. В это время бифидобактерии занимают доминирующую позицию, составляя 60–91% всей бактериальной популяции кишечника детей, находящихся на грудном вскармливании, и 28–75% — у детей на искусственном. С меньшей частотой у детей на грудном вскармливании выделяют лактобактерии и стрептококки, а у детей на искусственном — стафилококки, энтеробактерии и клостридии [1]. К двухлетнему возрасту, когда микрофлора кишечника полностью сформирована, содержание бифидобактерий снижается до 1–3% [2].

Формирование микрофлоры желудочно-кишечного тракта в раннем периоде жизни оказывает значимое влияние на созревание иммунной системы человека. В многочисленных исследованиях было показано,

что у детей, находившихся на грудном вскармливании, гораздо реже развивались инфекции желудочно-кишечного тракта и атопические заболевания по сравнению с детьми на искусственном вскармливании [3, 4]. Предполагают, что эффект грудного молока опосредуется бактериями нормальной микрофлоры кишечника, которая характеризуется малым разнообразием и высокой концентрацией бифидобактерий [5].

Кроме того, бифидобактерии обладают высокой антагонистической активностью в отношении патогенных микроорганизмов и способны препятствовать их проникновению в верхние отделы желудочно-кишечного тракта и внутренние органы. Молочная и уксусная кислота, продуцируемые бифидобактериями, способствуют усилению процессов всасывания в стенке кишечника ионов кальция, железа, витамина D.

Наиболее часто встречающимися видами бифидобактерий в кишечнике являются *Bifidobacterium*

E.V. Kulagina, Z.A. Tchernaya, A.N. Shkoporov, E.V. Khokhlova, B.V. Yefimov, J.M. Golubtsova, L.I. Kafarskaya

N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

## Influence of the milk formula enriched with bifidobacteria strain BB12 on development of intestinal microflora in newborns

The study deals with qualitative and quantitative structure of normal intestinal microflora in newborns before and after feeding with the formula «Agusha Gold 1» containing the strain *B. lactis* BB12. The specific structure of the intestinal bifidobacteria is studied in detail by means of the real-time polymerase chain reaction. It was demonstrated, that during the feeding with this formula there was a tendency towards development of the microbiota and specific structure of the intestinal bifidobacteria similar to those of the breast-fed children.

**Key words:** intestinal microflora, bifidobacteria, the real-time polymerase chain reaction.

*adolescentis*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium dentium*, *Bifidobacterium longum* и *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, реже обнаруживают *Bifidobacterium gallicum* [6]. Недавно виды *Bifidobacterium pseudolongum* и *Bifidobacterium thermophilum* были выделены из кишечника взрослых и детей, соответственно, хотя ранее полагали, что они присущи исключительно микрофлоре кишечника животных [6]. Кроме того, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* могут также выделяться из фекальной микрофлоры, поскольку бифидобактерии этого вида обычно используют для приготовления пробиотических продуктов. Установлено, что часто встречающимися видами в микрофлоре кишечника взрослых людей являются *B. adolescentis* и *B. longum*, а у детей первых месяцев жизни, находящихся на естественном вскармливании, — *Bifidobacterium infantis* и *B. breve*.

В научно-исследовательском центре компании «Вимм-Билль-Данн», опираясь на последние достижения нутрициологии, разработана сухая адаптированная молочная смесь «Агуша Gold». Включение в состав этого продукта комбинации галакто- и фруктоолигосахаридов в сочетании с пробиотическим штаммом бифидобактерий BB12 обеспечивает синбиотические свойства смеси, аналогичные таковым в грудном молоке. Это способствует формированию оптимального состава кишечной микрофлоры у младенцев и, соответственно, полноценного барьера слизистой оболочки кишечника, а также модуляции защитных механизмов организма.

Штамм *B. lactis* BB12, входящий в состав смеси, охарактеризован как наиболее изученный, а его эффективность подтверждена результатами многочисленных клинических исследований [7].

Бифидобактерии оказывают существенное влияние на нормальное функционирование желудочно-кишечного тракта человека, поэтому изучение их качественного и количественного состава в составе нормальной микрофлоры кишечника имеет большое значение. Ранее изучение параметров колонизации кишечника бифидобактериями проводилось с использованием только культуральных методов, однако они не позволяют в полной мере оценить их видовой состав. В настоящее время широко применяются методы, основанные на изучении и сравнении генов рибосомальной рибонуклеиновой кислоты прокариот с коэффициентом седиментации 16 единицы Сведберга (16S рРНК) [8].

В работах последних лет с использованием в качестве метода видовой детекции бифидобактерий полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР РВ) было установлено, что у детей в возрасте 1 мес чаще других встречаются бактерии видов *B. breve*, *B. infantis* и *B. longum* (70, 41 и 37%, соответственно). При этом среднее число видов бифидобактерий у детей составляет 2,1, что позволяет говорить об относительной бедности видовой разнообразия бактерий этого рода у детей раннего возраста по сравнению со взрослыми [9].

**Цель исследования:** изучить влияние указанной сухой адаптированной молочной смеси на формирование микробиотического кишечника у детей первого месяца жизни.

## МЕТОДЫ

### Участники исследования

В исследовании приняли участие 17 детей первого месяца жизни, которые находились преимущественно на вскармливании изучаемой сухой молочной смесью с синбиотическими свойствами. Дети были разделены на 2 группы. Первую группу обследуемых составили 9 детей,

которым был проведен 3-кратный забор материала: в 1-е сут жизни, на 3–4-е сут и на 7–9-й день. Во вторую группу вошли 8 детей, которым также провели 3-кратный забор материала: в 1-е сут жизни, затем через неделю и месяц со дня рождения. Принимая во внимание то, что в этом возрастном периоде бифидобактерии являются доминирующей группой сахаролитических бактерий и имеют важное значение для поддержания здоровья ребенка, было решено выполнить прицельное изучение видового состава данных микроорганизмов при помощи метода ПЦР РВ.

### Культуральные методы

Материалом для исследования послужили фекалии, которые собирали стерильным шпателем и помещали в транспортный контейнер. В бактериологической лаборатории из исследуемого материала готовили серийные разведения в физиологическом растворе и высевали аликвоты в количестве 0,1 мл из разведений исследуемого материала от  $10^1$  до  $10^8$  раз на чашки Петри с селективными питательными средами. Для выделения бактерий рода *Bacteroides* материал высевали из  $10^{-7}$  и  $10^{-8}$  разведений на *Columbia agar* (Himedia, Индия) и *Schaedler agar* (Oxoid, Великобритания) с добавлением витамина  $K_1$  (фитоменадион, 1,5 мг/л) и крови (5%). Чашки с посевами инкубировали в микроанаэрозоатах (Oxoid, Великобритания), заполненных газовой смесью (85%  $N_2$ , 10%  $H_2$ , 5%  $CO_2$ ) при 37°C в течение 48 ч.

Для выделения представителей рода *Bifidobacterium* исследуемый материал высевали из разведений  $10^{-5}$  и  $10^{-7}$  на *Bifidobacterium agar* (Himedia, Индия). Бифидобактерии идентифицировали по характерной морфологии в мазках, окрашенных по методу Грама. Чашки с посевами инкубировали в микроанаэрозоатах (Oxoid, Великобритания), заполненных газовой смесью (85%  $N_2$ , 10%  $H_2$ , 5%  $CO_2$ ) при 37°C в течение 48 ч.

Лактобациллы выделяли на среде *MRS-agar* (Oxoid, Великобритания). Для посева лактобактерий из кишечного содержимого посев производился из разведений исследуемого материала в  $10^3$  и  $10^5$  раз. Чашки инкубировали в анаэрозоатах, продутых газовой смесью, без палладиевых катализаторов 48 ч при 37°C.

Клостридии определяли путем посева исследуемого материала на среду *TSN-agar* (Oxoid, Великобритания) с добавлением эмульсии яичного желтка (50 мл/л). В 10 мл такой среды вносили 0,1 мл материал из  $10^{-3}$  и  $10^{-5}$  разведения, тщательно перемешивали и выливали на чашку Петри. После застывания агара поверхность среды покрывали еще одним слоем расплавленной и остуженной среды в объеме 10 мл. Клостридии (в частности, *Clostridium perfringens*) на этой среде образуют колонии черного цвета.

Микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* выделяли на среде *Endo-agar* (Serva, Германия). Посев производили из разведений исследуемого материала в  $10^5$  и  $10^7$  раз и инкубировали при 37°C 48 ч. При учете отмечали отдельно лактозонегативные и лактозопозитивные колонии. Бактерии из всех типов колоний высевали на сердечно-мозговой агар (Himedia, Индия) с добавлением 5% крови для выявления гемолизинпродуцирующих штаммов. Предварительную идентификацию бактерий из подозрительных колоний осуществляли посредством посева бактерий на дифференциально-диагностическую среду Клиггера (Serva, Германия).

Кроме того, каждое исследование сопровождали посевом на среду *Salmonella-Shigella-agar* (Serva, Германия). Посев производили из разведений исследуемого мате-

риала в  $10^3$  раз и инкубировали чашки с посевами при  $37^\circ\text{C}$  48 ч.

Стафилококки выделяли на среде *Staphylococcus agar* № 110 (Himedia, Индия) в разведениях исследуемого материала в  $10^1$  и  $10^3$  раз. Патогенные стафилококки, относящиеся к виду *Staphylococcus aureus*, дают на этой среде колонии с желтой пигментацией.

Для выделения энтерококков использовали среду *Enterococcus-agar* (Serva, Германия). Посев производили из разведения исследуемого материала в  $10^3$  и  $10^5$  раз. Инкубацию проводили при  $37^\circ\text{C}$  48 ч. Энтерококки образовывали колонии диаметром 1–2 мм с ровными краями, с характерной розовой, красной или коричневой окраской.

Дрожжеподобные грибы рода *Candida* выращивали на среде *Sabouraud Dextrose-agar* (Serva, Германия) с добавлением хлорамфеникола (400 мг/л). Посев производили из  $10^{-1}$  и  $10^{-3}$  разведений, чашки инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  24–48 ч. Грибы рода *Candida* определяли по наличию белых матовых колоний на чашках и по окраске: грамположительные, крупные, округлые, несколько удлинённые по форме клетки.

### Молекулярно-генетические методы

#### Выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты

Выделение тотальной ДНК из фекалий выполняли при помощи набора «ZR Fecal DNA Kit» (Zymo Research, США) в соответствии с рекомендациями изготовителя.

#### Полимеразная цепная реакция

ПЦР РВ осуществляли с использованием готовых 2,5X ПЦР-смесей (Синтол, Россия), содержащих интеркалирующий краситель EvaGreen и блокирующие антитела к Taq-полимеразе (создание эффекта «горячего старта»). В реакционные смеси объемом 25 мкл добавляли 1 мкл препарата кДНК и праймеры до финальной концентрации 0,2 мкМ. ПЦР проводили в приборе «АНК-32» (Синтол, Россия) согласно следующей программе: 1) денатурация —  $94^\circ\text{C}$ , 20 с; 2) отжиг праймеров —  $58^\circ\text{C}$ , 20 с; 3) элонгация —  $72^\circ\text{C}$ , 20 с. Длительность программы составляла 40 циклов.

Флуоресценцию в пробирках детектировали в режиме реального времени на канале FAM (возбуждение 492 нм, эмиссия 520 нм). Значения пороговых циклов определялись прибором автоматически. Верификацию продуктов ПЦР осуществляли при помощи записи кривых плавления от 60 до  $95^\circ\text{C}$  с инкрементом  $0,5^\circ\text{C}$  и временем на полке 15 с.

Видовую идентификацию бифидобактерий проводили при помощи ПЦР РВ с 8 парами видоспецифичных праймеров (табл. 1).

### Статистическая обработка данных

Статистическую обработку полученных результатов производили с применением программ «Microsoft Excel» и «Primer of biostatistics» (McGraw-Hill, США). Для выполнения статистического анализа полученные результаты представляли в lg числа микробов на 1 г исследуемого материала и помещали в базу данных в программе «Primer of biostatistics».

Поскольку исследуемая выборка имела нормальное распределение, то для каждой таксономической группы микроорганизмов в каждой группе детей считали среднее значение концентрации, стандартное отклонение и частоту встречаемости. Определение достоверности различий в количественных показателях микроорганизмов между различными группами проводили с использованием непараметрического рангового U-критерия Манна–Уитни. Для определения достоверности различий в частоте выявления различных таксономических групп микроорганизмов между группами обследуемых людей использовали  $\chi^2$ -критерий и точный критерий Фишера. Во всех случаях различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ

В первой группе обследуемых бифидобактерии были выделены в 3 случаях (33,3%) в количестве  $10,3 \pm 0,6$  lg КОЕ/г кишечного содержимого. Лактобактерии были обнаружены у 4 детей (44,4%) в концентрации  $8,3 \pm 1,3$  lg КОЕ/г. Кроме того, в 44,4% случаев были идентифицированы представители семейства

Таблица 1. Набор олигонуклеотидных праймеров, используемых для видовой идентификации бифидобактерий

Вид бифидобактерий	Праймер	Последовательность	Длина праймера, пн	Размер ПЦР-продукта, пн
<i>B. adolescentis</i>	BiADO-1	CTCCAGTTGGATGCATGTC	19	279
	BiADO-2	CGAAGGCTTGCTCCCAGT	18	
<i>B. angulatum</i>	BiANG-1	CAGTCCATCGCATGGTGGT	19	275
	BiANG-2	GAAGGCTTGCTCCCCAAC	18	
<i>B. bifidum</i>	BiBIF-1	CCACATGATCGCATGTGATTG	21	278
	BiBIF-2	CCGAAGGCTTGCTCCCCAAA	19	
<i>B. breve</i>	BiBRE-1	CCGGATGCTCCATCACAC	18	288
	BiBRE-2	ACAAAGTGCCTTGCTCCCT	19	
<i>B. catenulatum</i>	BiCAT-1	CGGATGCTCCGACTCCT	17	285
	BiCAT-2	CGAAGGCTTGCTCCCGAT	18	
<i>B. longum</i>	BiLON-1	TTCCAGTTGATCGCATGGTC	20	831
	BiLON-2	GGGAAGCCGTATCTCTACGA	20	
<i>B. infantis</i>	BiINF-1	TTCCAGTTGATCGCATGGTC	20	828
	BiINF-2	GGAAACCCATCTCTGGGAT	20	
<i>B. dentium</i>	BiDEN-1	ATCCCGGGGGTTCGCCT	17	387
	BiDEN-2	GAAGGGCTTGCTCCCGA	17	

*Enterobacteriaceae* в количестве  $10,1 \pm 0,3$  Ig КОЕ/г исследуемого материала. Стафилококки колонизировали кишечник 9 детей (100%,  $7,5 \pm 0,9$  Ig КОЕ/г), в т.ч. среди них у 6 (66,6%) были диагностированы *S. aureus* ( $6,3 \pm 0,6$  Ig КОЕ/г). Энтерококки были выделены у всех членов группы в количестве  $9,3 \pm 1,3$  Ig КОЕ/г.

Повторное обследование дети из первой группы проходили через 3–4 дня после первого. Бифидобактерии выявлялись с более высокой частотой, чем при первичном обследовании, они колонизировали кишечник 5 детей (55,5%) в концентрации  $9,1 \pm 1,2$  Ig КОЕ/г кишечного содержимого. Лактобактерии и энтеробактерии также выделялись чаще: у 8 детей (88,8%) в количестве  $7,2 \pm 1,7$  Ig КОЕ/г и  $10 \pm 0,9$  Ig КОЕ/г, соответственно. *S. aureus*, напротив, были выделены только от 2 детей (22%,  $5,0 \pm 0,5$  Ig КОЕ/г). Энтерококки обнаружены у всех обследуемых (100%) в количестве  $9,6 \pm 1,3$  Ig КОЕ/г.

После третьего исследования бифидобактерии были выделены у всех обследуемых (100%) в концентрации  $9,6 \pm 0,6$  Ig КОЕ/г. Лактобактерии обнаружены у 7 детей (77,7%) в количестве  $7,6 \pm 1,8$  Ig КОЕ/г кишечного содержимого. У всех обследуемых также обнаружены энтеробактерии, стафилококки и энтерококки в концентрациях  $9,5 \pm 1,2$ ,  $5,7 \pm 0,8$  и  $8,6 \pm 1,4$  Ig КОЕ/г, соответственно (табл. 2).

Во второй группе при первичном исследовании бифидобактерии были обнаружены у 5 детей (62,5%) в количестве  $8,9 \pm 1,4$  Ig КОЕ/г, лактобактерии — у 6 детей (75%) в количестве  $7,0 \pm 1,6$  Ig КОЕ/г, энтеробактерии — у 5 детей (62,5%) в концентрации  $9,3 \pm 1,0$  Ig КОЕ/г. Стафилококки колонизировали кишечник у 7 обследуемых (87,5%) в количестве  $6,2 \pm 1,0$  Ig КОЕ/г. Из них в одном случае (12,5%) были выделены *S. aureus* ( $6,3$  Ig КОЕ/г). Энтерококки в высокой концентрации ( $9,4 \pm 0,7$  Ig КОЕ/г) заселяли кишечник 7 детей (87,5%).

При повторном исследовании, проведенном через 1 нед после первого, бифидобактерии были обнаружены только у 3 детей (37,5%,  $8,1 \pm 1,8$  Ig КОЕ/г). Бактерии рода *Bacteroides* не были выделены ни у одного ребенка. Лактобактерии определялись у 5 детей (62,5%,  $7,3 \pm 1,1$  Ig КОЕ/г). Энтеробактерии были выделены у 6 обследуемых (75%,  $9,7 \pm 0,6$  Ig КОЕ/г). Стафилококки обнаруживались только у половины обследуемых в кон-

центрации  $5,4 \pm 0,8$  Ig КОЕ/г. Энтерококки колонизировали кишечник всех обследуемых в высокой концентрации  $8,7 \pm 1,2$  Ig КОЕ/г.

В ходе последнего исследования бифидобактерии были выделены у 7 из 8 обследуемых (87,5%) в высокой концентрации ( $9,8 \pm 0,7$  Ig КОЕ/г). Лактобактерии и энтерококки идентифицированы у 6 детей (75%) в количестве  $7,2 \pm 1,3$  и  $9,3 \pm 0,9$  Ig КОЕ/г, соответственно. Стафилококки выделены у 5 детей (62,5%) в концентрации  $6,1 \pm 0,6$  Ig КОЕ/г (табл. 3).

Видовая идентификация бифидобактерий была проведена при помощи ПЦР РВ. У 4 детей первой группы (44,4%) при первичном исследовании были выделены бифидобактерии, среди которых встречались представители видов *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. catenulatum* и *B. adolescentis*. Число видов на один образец в среднем составляло  $1,5 \pm 0,6$ .

При повторном исследовании бифидобактерии суммарно были выделены у 5 детей (55,6%): *B. angulatum* были обнаружены в трех случаях (33,3%), *B. bifidum* — в двух (22,2%), а также встречались *B. infantis*, *B. longum*, *B. catenulatum*, *B. adolescentis*, *B. dentium* и *B. breve* — по одному каждый (11,1%). Число разных видов на один образец было выше по сравнению с первичным исследованием и составляло в среднем  $2,2 \pm 1,3$ .

В ходе третьего исследования бифидобактерии диагностированы у всех обследуемых (100%), и среди них идентифицированы виды *B. bifidum* и *B. dentium* в одном случае (11,1%), *B. longum* и *B. angulatum* — в трех (33,3%). Среднее число видов на один образец составляло  $1,5 \pm 1,0$  (табл. 4).

При исследовании видового состава бифидобактерий у второй группы детей при первом посеве бифидобактерии были выделены у 5 из 8 детей (62,5%), из них *B. bifidum* — в 3 случаях (37,5%), *B. infantis* и *B. dentium* — в 2 (25%), *B. longum*, *B. breve* и *B. catenulatum* — по 1 (12,5%). В среднем число видов в одном образце составляло  $1,0 \pm 0,9$  (табл. 5).

При повторном исследовании, проведенном через 1 нед после первого, бифидобактерии были выделены только у 3 человек (37,5%) и принадлежали видам *B. bifidum* (37,5%), *B. infantis* и *B. dentium* (25%), *B. breve* и *B. longum*

Таблица 2. Качественный и количественный состав микрофлоры кишечника у здоровых детей (первая группа)

Вид бактерий	Первый посев (1-е сут жизни), n = 9		Второй посев (через 3–4 дня), n = 9		Третий посев (через 7–9 дней), n = 9	
	Число/%	M ± m	Число/%	M ± m	Число/%	M ± m
Бифидобактерии	3/33,3	$10,3 \pm 0,6$	5/55,5	$9,1 \pm 1,2$	9/100	$9,6 \pm 0,6$
Лактобациллы	4/44,4	$8,3 \pm 1,3$	8/88,8	$7,2 \pm 1,7$	7/77,7	$7,6 \pm 1,8$
Энтеробактерии:	4/44,4	$10,1 \pm 0,3$	8/88,8	$10,1 \pm 0,9$	4/44,4	$9,5 \pm 1,2$
<i>Escherichia coli</i> (lac+/hem-)	2/22,2	$9,6 \pm 0,5$	7/77,7	$9,4 \pm 1,4$	4/44,4	$8,9 \pm 1,6$
<i>E. coli</i> (общ.)	2/22,2	$9,6 \pm 0,5$	7/77,7	$9,4 \pm 1,4$	4/44,4	$8,9 \pm 1,6$
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4/44,4	$9,8 \pm 0,9$	4/44,4	$9,6 \pm 1,1$	3/33,3	$9,1 \pm 1,7$
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	0	3/33,3	$10,2 \pm 0,4$	1/11,1	8,7
<i>Klebsiella</i> (общ.)	4/44,4	$9,8 \pm 0,9$	6/66,6	$9,7 \pm 0,9$	4/44,4	$8,7 \pm 1,2$
<i>S. aureus</i>	6/66,6	$6,3 \pm 0,6$	2/22,2	$5,0 \pm 0,5$	1/11,1	5,3
<i>Staphylococcus spp.</i>	7/77,7	$7,4 \pm 1,2$	6/66,6	$6,3 \pm 1,8$	4/44,4	$5,5 \pm 1,1$
<i>Staphylococcus</i> (общ.)	9/100	$7,5 \pm 0,9$	7/77,7	$6,3 \pm 1,6$	4/44,4	$5,7 \pm 0,8$
Энтерококки	9/100	$9,3 \pm 1,3$	9/100	$9,6 \pm 1,3$	9/100	$8,6 \pm 1,4$

Примечание. M — среднее значение концентрации; m — стандартное отклонение.

**Таблица 3.** Качественный и количественный состав микрофлоры кишечника у здоровых детей (вторая группа)

Вид бактерий	Первый посев (1-е сут жизни), n = 8		Второй посев (через 1 нед), n = 8		Третий посев (через 1 мес), n = 8	
	Кол-во/%	M ± m	Кол-во/%	M ± m	Кол-во/%	M ± m
Бифидобактерии	5/62,5	8,9 ± 1,4	3/37,5	8,1 ± 1,8	7/87,5	9,8 ± 0,7
Лактобациллы	6/75	7,0 ± 1,6	5/62,5	7,3 ± 1,1	6/75	7,2 ± 1,3
Энтеробактерии:	5/62,5	9,3 ± 1,0	6/75	9,7 ± 0,6	7/87,5	9,5 ± 0,6
<i>E. coli</i> (lac+/hem-)	3/37,5	9,6 ± 0,6	4/50	9,3 ± 0,2	4/50	8,9 ± 1,1
<i>E. coli</i> (lac-/hem-)	1/12,5	8,6	1/12,5	9,3	0	0
<i>E. coli</i> (lac-/hem-) общ.	1/12,5	8,6	1/12,5	9,3	0	0
<i>E. coli</i> (общ.)	3/37,5	9,6 ± 0,6	5/62,4	9,3 ± 0,2	4/50	8,9 ± 1,1
<i>K. pneumoniae</i>	4/50	8,3 ± 1,1	3/37,5	9,9 ± 0,6	3/37,5	8,6 ± 1,8
<i>K. oxytoca</i>	0	0	1/12,5	8,9	2/25	9,7 ± 0,5
<i>Klebsiella</i> (общ.)	2/25	8,7 ± 1,5	3/37,5	9,9 ± 0,6	5/62,4	9,0 ± 1,4
<i>Enterobacter spp.</i>	1/12,5	9,5	1/12,5	9,3	0	0
<i>S. aureus</i>	1/12,5	6,3	0	0	3/37,5	5,9 ± 0,7
<i>Staphylococcus spp.</i>	6/75	6,2 ± 1,0	4/50	5,4 ± 0,8	5/62,4	5,7 ± 0,9
<i>Staphylococcus</i> (общ.)	7/87,5	6,2 ± 1,0	4/50	5,4 ± 0,8	5/62,4	6,1 ± 0,6
Энтерококки	7/87,5	9,4 ± 0,7	8/100	8,7 ± 1,2	6/75	9,3 ± 0,9

Примечание. M — среднее значение концентрации; m — стандартное отклонение.

**Таблица 4.** Видовой состав бифидобактерий в составе микрофлоры кишечника здоровых детей (первая группа), определенный посредством полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

Вид бифидобактерий	Первый посев (1-е сут жизни), n = 9	Второй посев (через 3–4 дня), n = 9	Третий посев (через 7–9 дней), n = 9
	Число / %	Число / %	Число / %
<i>B. longum</i>	1/11,1	1/11,1	3/33,3
<i>B. bifidum</i>	1/11,1	2/22,2	1/11,1
<i>B. breve</i>	0	1/11,1	0
<i>B. catenulatum</i>	1/11,1	1/11,1	0
<i>B. adolescentis</i>	1/11,1	1/11,1	0
<i>B. infantis</i>	1/11,1	1/11,1	0
<i>B. dentium</i>	0	1/11,1	1/11,1
<i>B. angulatum</i>	1/11,1	3/33,3	3/33,3

**Таблица 5.** Видовой состав бифидобактерий в составе микрофлоры кишечника здоровых детей (вторая группа), определенный посредством полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

Вид бифидобактерий	Первый посев (1-е сут жизни), n = 8	Второй посев (через 1 нед), n = 8	Третий посев (через 1 мес), n = 8
	Число / %	Число / %	Число / %
<i>B. longum</i>	1/12,5	1/12,5	2/25
<i>B. bifidum</i>	3/37,5	3/37,5	3/37,5
<i>B. breve</i>	1/12,5	1/12,5	3/37,5
<i>B. catenulatum</i>	1/12,5	0	2/25
<i>B. adolescentis</i>	0	0	2/25
<i>B. infantis</i>	2/25	2/25	4/50
<i>B. dentium</i>	2/25	2/25	4/50
<i>B. angulatum</i>	0	0	0

(12,5%). Среднее число видов в одном образце в среднем составляло  $0,9 \pm 0,6$  и максимально равнялось 3.

В ходе третьего исследования бифидобактерии были выделены у 5 человек из 8 (62,5%). Частота встречаемости разных видов была следующей: *B. infantis* — 50%, *B. bifidum* и *B. breve* — 37,5%, *B. longum*, *B. catenulatum* и *B. adolescentis* — 25%.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Нормальная микрофлора, формирование которой начинается сразу после рождения, принимает участие в противоинфекционной защите организма человека. Ее представители находятся в тесной симбиотической ассоциации с макроорганизмом и способны активно противостоять его заселению экзогенными патогенными и условно-патогенными микроорганизмами. Антагонистическая активность бактерий-комменсалов связана с продукцией различных антимикробных соединений, конкуренцией за сайты прикрепления к эпителию и питательные вещества [10, 11].

Кроме того, бактерии кишечной микрофлоры модулируют местный иммунный ответ и принимают участие в различных метаболических и биосинтетических процессах. Именно поэтому нарушение качественного и количественного состава нормальной микрофлоры может приводить к неблагоприятным последствиям для здоровья человека [12].

Значительная часть нормальной микрофлоры кишечника у детей сформирована за счет строго анаэробных бактерий рода *Bifidobacterium* (тип *Actinobacteria*, класс *Actinobacteria*) [13]. Однако известно, что наряду с ними кишечник в раннем детском возрасте могут колонизировать представители семейства *Enterobacteriaceae*, *Lactococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus faecalis* и др. [14, 15].

В настоящей работе показано, что бифидобактерии колонизируют кишечник детей уже в первые сутки жизни

и в высокой концентрации. Кроме того, наблюдается тенденция к увеличению встречаемости и количества бактерий этого рода, а также рода лактобактерий в течение первого месяца жизни. Однако наряду с представителями молочнокислой микрофлоры в период новорожденности в кишечнике также формируется и популяция условно-патогенных бактерий, таких как стафилококки, в т. ч. *S. aureus*, энтерококки и энтеробактерии, которые заселяют кишечник ребенка в высокой концентрации.

Кроме того, наблюдается тенденция к увеличению количества и видового разнообразия бифидобактерий в микрофлоре толстой кишки у новорожденных. По результатам исследования, у детей в первые дни жизни кишечник в среднем был заселен одним видом бифидобактерий, в то время как уже через месяц среднее число видов составляло 2 и более. Наиболее часто среди бифидобактерий доминировали *B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, что согласуется с ранее полученными данными [16].

Для определения видового состава бифидобактерий использована комбинация классических культуральных и молекулярно-генетических методов исследования, поскольку применение методов, основанных исключительно на изучении фенотипических свойств этой группы микроорганизмов, не позволяет достоверно определять их таксономическую принадлежность [2].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на основании полученных результатов можно говорить о том, что на фоне употребления сухой адаптированной молочной смеси «Агуша Gold 1» происходит формирование микробиоты и видового состава бифидобактерий кишечника, сходных с таковыми при грудном вскармливании [17, 18]. Однако эти результаты свидетельствуют лишь о тенденции к изменению видового состава бактерий, и для получения четких данных требуется проведение более развернутых исследований.

### REFERENCES

- Harmsen H.J., Wildeboer-Veloo A.C., Raangs G.C. et al. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000; 30 (1): 61–67.
- Satokari R.M., Vaughan E.E., Smidt H. et al. Molecular approaches for the detection and identification of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract. *Syst Appl Microbiol.* 2003; 26 (4): 572–584.
- Howie P.W., Forsyth J.S., Ogston S.A. et al. Protective effect of breast feeding against infection. *BMJ.* 1990; 300 (6716): 11–16.
- van Odijk J., Kull I., Borres M.P. et al. Breastfeeding and allergic disease: a multidisciplinary review of the literature (1966–2001) on the mode of early feeding in infancy and its impact on later atopic manifestations. *Allergy.* 2003; 58 (9): 833–843.
- Edwards C.A., Parrett A.M. Intestinal flora during the first months of life: new perspectives. *Br. J. Nutr.* 2002; 88 (Suppl. 1): S11–18.
- Junick J., Blaut M. Quantification of human fecal *Bifidobacterium* species by quantitative real-time PCR targeting the *groEL* gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012.
- Salminen S., Benno Y., de Vos W. Intestinal colonisation, microbiota and future probiotics? *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 2006; 15 (4): 558–562.
- Matsuki T., Watanabe K., Fujimoto J. et al. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68 (11): 5445–5451.
- Matsuki T., Watanabe K., Fujimoto J. et al. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70 (12): 7220–7228.
- Korshunov V.M., Smeyanov V.V., Yefimov B.A. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk — Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 1996; 2: 60–64.
- Backhed F., Ley R.E. et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science.* 2005; 307 (5717): 1915–1920.
- Bondarenko V.M., Vorob'yev A.A. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii — Journal of Epidemiology, Microbiology and Immunology.* 2004; 1: 84–92.
- Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N. et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science.* 2005; 308: 1635–1638.
- Yefimov B.A. *Mikroekologiya kishechnika cheloveka, korrektsiya mikroflory pri disbioticheskikh sostoyaniyakh* [Microecology of Human Intestines, Microflora Correction at Dysbiotic States]. Thesis for the degree of Doctor of Medical Science. 2005.

15. Park H.K., Shim S.S., Kim S.Y. et al. Molecular analysis of colonized bacteria in a human newborn infant gut. *J. Microbiol.* 2005; 43 (4): 345–353.

16. Matsuki T., Watanabe K., Tanaka R. et al. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65 (10): 4506–4512.

17. Mackie R.I., Sghir A., Gaskins H.R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 1999; 69 (5): 1035S–1045S.

18. Morelli L. Postnatal development of intestinal microflora as influenced by infant nutrition. *J. Nutr.* 2008; 138 (9): 1791–1795.