

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «ДАГЕСТАНСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА  
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*

**АЛИЕВА**

**Аминат Исагаевна**

**ДИАГНОСТИКА НЕОНАТАЛЬНЫХ ПНЕВМОНИЙ:  
КЛИНИКО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ  
АСПЕКТЫ**

03.02.03 – микробиология

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

Научные консультанты:

Салидат Магомедовна Омарова  
доктор биологических наук, доцент

Оксана Анатольевна Свитич  
чл.-корр. РАН, доктор медицинских наук

Махачкала - 2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

	ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1.	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. НЕОНАТАЛЬНЫЕ ПНЕВМОНИИ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ .....	18
1.1.	Этио-патогенетические и клинические особенности пневмоний у новорожденных .....	22
1.2.	Проблема антибиотикорезистентности микроорганизмов, возбудителей пневмоний у новорожденных.....	30
1.3.	Роль бактериальных биопленок в развитии неонатальных пневмоний.....	34
1.4.	Особенности иммунной системы новорожденных в норме и при патологии дыхательной системы.....	39
1.5.	Механизмы ускользания бактерий от иммунных реакций организма новорожденного.....	47
1.6.	Актуальные проблемы диагностики неонатальных пневмоний	53
ГЛАВА 2.	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	60
2.1.	Общая характеристика обследованных новорожденных.....	60
2.2.	Методы исследования.....	64
2.2.1.	Клинические методы исследования.....	65
2.2.2.	Рентгенологическое исследование.....	68
2.2.3.	Микробиологические методы исследования.....	68
2.2.4.	Методы, используемые для диагностики показателей иммунитета.....	79
2.2.4.1.	Выделение нуклеиновых кислот (ДНК и РНК).....	80
2.2.4.2.	Реакция обратной транскрипции.....	82
2.2.4.3.	Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.....	83
2.2.5.	Биоинформационный анализ.....	86
2.2.6.	Статистические методы обработки данных.....	86
ГЛАВА 3.	СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ. КЛИНИКО- РЕНТГЕНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НЕОНАТАЛЬНЫХ ПНЕВМОНИЙ.....	88
3.1.	Предикторы риска развития неонатальных пневмоний.....	89
3.2.	Дифференциальная диагностика внутриутробных и ранних неонатальных пневмоний .....	93
3.3.	Роль внутриутробных инфекций в развитии неонатальных	

	пневмоний.....	103
ГЛАВА 4.	ЗНАЧЕНИЕ САНИТАРНО-ПОКАЗАТЕЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В РАЗВИТИИ НЕОНАТАЛЬНЫХ ПНЕВМОНИЙ.....	114
4.1.	Санитарно-бактериологическое исследование воздушной среды родильного дома.....	116
4.2.	Изучение микробиоты объектов внешней среды родильного дома .....	119
4.3.	Определение микробного носительства среди медицинского персонала ОРИТН родильного дома.....	122
ГЛАВА 5.	ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ НЕОНАТАЛЬНЫХ ПНЕВМОНИЙ.....	128
5.1.	Микробиологическая диагностика внутриутробных пневмоний	129
5.2.	Микробиологическая диагностика ранних неонатальных пневмоний.....	142
5.2.1.	Изучение факторов патогенности <i>Klebsiella pneumoniae</i> на молекулярно-генетическом уровне.....	151
5.3.	Сравнительный анализ результатов микробиологического исследования новорожденных с ВУП и РНП.....	155
ГЛАВА 6.	АНАЛИЗ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ НЕОНАТАЛЬНЫХ ПНЕВМОНИЙ .....	160
ГЛАВА 7.	КОМПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ ЭКСПРЕССИОННЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧЕК РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА У НОВОРОЖДЕННЫХ С ВУП И РНП.....	174
7.1.	Биоинформационный анализ молекулярно-генетических процессов при неонатальных пневмониях.....	176
7.2.	Оценка факторов врожденного иммунитета в клетках слизистой респираторного тракта здоровых новорожденных.....	197
7.3.	Изменение показателей врожденного иммунитета у новорожденных с ВУП и РНП.....	200
7.4.	Изменение показателей врожденного иммунитета у новорожденных с пневмонией в зависимости от этиологии возбудителя.....	204
ГЛАВА 8.	ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ В ГЕНАХ TLRS, DEFБ1 И ЦИТОКИНОВ У НОВОРОЖДЕННЫХ С НЕОНАТАЛЬНЫМИ	

	ПНЕВМОНИЯМИ.....	209
8.1.	Исследование ассоциации полиморфных маркеров в генах TLR2 и TLR4 у родильниц и новорожденных с НП.....	211
8.2.	Изучение ассоциации полиморфного маркера <i>G(-20)A</i> у родильниц и новорожденных с НП.....	217
8.3.	Изучение ассоциации полиморфных маркеров в генах <i>IL-10</i> , <i>IL-17</i> и <i>TNF<math>\alpha</math></i> у родильниц и новорожденных с НП.....	221
	Заключение.....	239
	Выводы.....	267
	Практические рекомендации.....	269
	Список сокращений и условных обозначений.....	270
	Список литературы.....	271
	Приложение.....	293

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Перинатальная патология стоит на первом месте в структуре младенческой заболеваемости и смертности в РФ [10; 20; 50; 111; 115; 134; 173]. Неонатальные пневмонии (НП) являются одним из наиболее тяжелых её проявлений [31]. В соответствии с официальными статистическими данными частота заболеваемости пневмонией составляет около 1% среди доношенных и порядка 10% среди недоношенных детей и достигает до 40% у новорожденных, находящихся в отделении реанимации и интенсивной терапии, при различных видах респираторной терапии [58].

В 2007 году M.D. Nissen опубликовал данные о том, что ежегодно в мире от пневмонии умирает от 0,75 до 1,20 млн. новорожденных, что составляет 10% от детской смертности в мире. Особую проблему представляют дети, находящиеся в отделениях реанимации и интенсивной терапии новорожденных (ОРИТН) [178].

Возрасла частота неонатальных пневмоний с крайне тяжелым и «молниеносным» течением, появляются антибиотикорезистентные штаммы бактерий, которые осложняют проведение терапии и мониторинг заболевания. В связи с этим, крайне важно изучение респираторных инфекций у новорожденных [73; 90; 121; 155; 77]. Несмотря на проведение этиотропной антибактериальной терапии, все еще остаются высокими показатели смертности среди новорожденных [7; 69; 103; 115 39; 126; 135].

Неонатальная пневмония может быть классифицирована на внутриутробную (ВУП) и раннюю неонатальную пневмонию (РНП). Внутриутробная пневмония – воспаление легких, сформировавшееся в процессе пренатального развития у плода или развившееся в течение первых 72 часов после рождения, при котором поражение респираторного тракта оказывается ведущей формой заболевания или частью генерализованного остроинфекционного процесса [69]. Ранней неонатальной пневмонией называют пневмонию, клинические проявления которой развиваются на третьи сутки после рождения. Вместе с тем, при установлении диагноза пневмонии у ребенка в возрасте двух и

более суток, находящегося в условиях родовспомогательного учреждения, достаточно непросто провести дифференциальную диагностику между внутриутробной и ранней неонатальной пневмониями, так как, клиническая картина очень часто не содержит явных отличий [20; 25; 31]. В этиологическом и эпидемиологическом плане ВУП и РНП имеют некоторые популяционные характеристики, «установки» родильного стационара, особенности перинатального периода, гестационного возраста и др. [31]. Неонатальная пневмония, как известно, является полиэтиологическим заболеванием, вызываемым множеством факторов, в частности микробиологических. Цикличность перемены (каждые 5-10 лет) основных этиопатогенов подтверждает своевременность и важность регионального мониторинга респираторных инфекций [45; 83; 116; 210].

Последние годы ключевая роль отводится изучению предикторов развития заболеваний [38; 54; 69; 115; 116]. На сегодняшний день актуальным является сопряженное исследование действия факторов риска на развитие неонатальных пневмоний с целью осуществления соответствующих профилактических мероприятий [13; 40; 73; 152]. Дискутабельными остаются вопросы специфичности этиопатогенов, клинического течения и дифференциальной диагностики неонатальных пневмоний [73]. Риск развития данной патологии у новорожденных, скорее всего, предопределена не только специфичностью госпитальных штаммов микроорганизмов, но и состоянием иммунитета новорожденных. Так, к примеру, большое значение в распознавании патогенов имеют факторы врожденного иммунитета (Toll-подобные рецепторы, цитокины, противомикробные пептиды) [19; 22]. У новорожденных механизмы врожденного иммунитета осуществляют основную защиту от патогенов, и, можно предположить, что изменения в системе врождённого иммунитета служат одной из причин риска развития инфекционной патологии. В последние годы большое внимание уделяется выявлению иммунологических прогностических маркёров неонатальных пневмоний [22; 24].

Следовательно, актуальным является дальнейший поиск и внедрение в клиническую практику точных, высокоспецифичных, доступных в стационарах, высокоинформативных и прогностически значимых методов диагностики, обладающих возможностью на доклинической стадии выявить вероятный риск развития неонатальных пневмоний, а также их разновидностей (ВУП и РНП).

**Цель исследования:** провести комплексное микробиологическое и иммунологическое исследование неонатальных пневмоний и разработать на основе полученных данных прогностические и диагностические критерии развития внутриутробных и ранних неонатальных пневмоний.

**Задачи исследования:**

1. Изучить клинико-рентгенологические факторы риска развития пневмоний у новорожденных.
2. Определить особенности видового состава микроорганизмов – возбудителей неонатальных пневмоний, а также их разновидностей (ВУП и РНП).
3. Провести оценку резистентности возбудителей к антибактериальным препаратам у новорожденных с неонатальными пневмониями и исследовать роль резистентных штаммов в развитии патологии.
4. Изучить экспрессионный профиль факторов врожденного иммунитета (TLRs, цитокинов, противомикробных пептидов и др.) на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей при внутриутробной пневмонии и ранней неонатальной пневмонии.
5. Определить ассоциацию полиморфных маркеров, локализованных в генах *TLR2*, *TLR4*, *DEFB1*, *IL10*, *IL17*, *TNFA* с риском развития неонатальных пневмоний.
6. На основании микробиологических и иммунологических результатов разработать новые диагностические и прогностические маркеры развития внутриутробных и ранних неонатальных пневмоний у новорожденных.

### **Научная новизна полученных результатов**

На основании клинико-микробиологических и иммунологических исследований получены новые данные по современной этиологической структуре, факторам врожденного иммунитета, особенностям клинического течения неонатальных пневмоний и антибиотикорезистентности выделенных штаммов микроорганизмов.

Впервые определены доминирующие виды условно-патогенных грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов и выявлена их роль в возникновении пневмоний у новорожденных в Республике Дагестан. Установлено, что среди основных возбудителей ВУП преобладают микроорганизмы семейства *Staphylococcus* (*S.epidermidis*), а РНП лидируют микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* (*K. pneumoniae*, *E. coli*).

Выявлены отдельные закономерности антибиотикорезистентности выделенных штаммов возбудителей внутриутробных и ранних неонатальных пневмоний.

Впервые выявлено снижение иммунологических показателей (TLRs, NBDs), которое коррелировало с основными этиопатогенами неонатальных пневмоний. Впервые определены иммуногенетические маркеры, ассоциированные с риском развития пневмонии.

Предложен и апробирован новый алгоритм диагностики неонатальных пневмоний, включающий комплекс методов, направленных на выявление, идентификацию возбудителей, а также определение показателей врожденного иммунитета.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Результаты настоящего исследования вносят существенный вклад в изучение неонатальных пневмоний, дополняют научные представления об этиопатогенах и их биологических особенностях, особенностях клинического течения пневмонии в зависимости от возбудителя и резистентности к антибактериальным препаратам.

Научно обоснована роль факторов патогенности возбудителей неонатальных пневмоний на организм новорожденного и их влияние на показатели врожденного иммунитета.

Зафиксированные при ВУП и РНП общие закономерности и кардинальные отличия в микробиологических и иммунологических показателях, сопряженные с тяжестью течения неонатальных пневмоний, дополняют представления о механизмах формирования врожденного иммунитета. Снижение экспрессии генов TLR2, TLR4 и увеличение экспрессии генов TNF $\alpha$  и NF-kB в дебюте неонатальных пневмоний являются важными прогностическими факторами неблагоприятного течения и дополнительными предикторами развития НП.

Высокая специфичность, прогностическая ценность и прямая корреляция с инфекционным возбудителем НП с тяжестью течения, позволяет предположить, что непосредственно возбудитель за счет действия факторов патогенности влияет на показатели врожденного иммунитета.

Найдена ассоциация полиморфных маркеров в генах *IL-17*, *DEFB1*, *TLR4* с риском развития внутриутробного инфицирования плода. Показано, что генотип *AG* (ген *IL10 -1082 A>G*) и *GG* (*TNF $\alpha$  -308 G>A*) ассоциированы с риском развития неонатальных пневмоний. Разработан алгоритм диагностики неонатальных пневмоний.

### **Методология и методы исследования**

Методология настоящего исследования спланирована, исходя из современных принципов научного познания [52]. Методология организована адекватно поставленной цели. Предметом исследования стали проблемы, связанные с диагностикой неонатальных пневмоний.

Анализ научной литературы, посвященный проблеме неонатальных пневмоний, проведен на основе формально-логических методов исследования. Планирование и проведение исследований, направленных на решение поставленных задач, осуществлялось на основе общенаучных и специфических методов. В работе применялись следующие методы исследования:

бактериологические, иммунологические, молекулярно-генетические; метод иммерсионной микроскопии. Результаты анализировались при помощи статистических методов.

Автором проведен анализ результатов клинико-рентгенологического, микробиологического и молекулярно-генетического тестирования с целью сравнения с существующими диагностическими стандартами НП. При выполнении работы использовали отечественные и международные научные базы данных и информационные ресурсы, такие как «PubMed», «E-library», «ScienceDirect», «Scirus» и другие, материалы российских и зарубежных журналов.

Анализ полученных результатов проводили с использованием общепринятых статистических методов анализа данных с использованием параметрических и непараметрических методов программные пакеты SPSS Statistic, 17.0.1. международные компьютерные базы данных, что обеспечило достоверность сформулированных положений, выводов и рекомендаций. Уровень значимости для всех проверяемых гипотез -  $p < 0,05$ . Описательная статистика исследуемых качественных признаков представлена абсолютными значениями, удельным весом и их стандартными ошибками.

### **Личное участие автора в получении результатов**

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом НИР кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет» МЗ РФ.

Участие автора заключалось в выборе темы диссертации, формулировке цели и задач, разработке критериев включения/невключения пациентов в исследование, в анализе медицинской и статистической документации (истории родов, истории развития новорожденных) по заболеваемости неонатальными пневмониями в республике Дагестан, в комплексном клинико-лабораторном обследовании новорожденных, сборе материала и получении результатов изложенных в диссертационной работе.

Анализ данных отечественной и зарубежной литературы по теме диссертации, статистическая обработка полученных результатов, разработка алгоритма дифференциальной диагностики неонатальных пневмоний на основе клинико-рентгенологических, микробиологических, иммунологических и генетических данных и написание диссертации выполнено лично автором.

Изучение выделенной микробиоты осуществлялось на базе кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет» МЗ РФ и в лаборатории «Клиническая микробиология» ООО НПП «Питательные среды» г. Махачкала. Иммунологические исследования были выполнены в лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва.

Вклад коллег отражен в соавторстве в ряде работ, опубликованных в периодических научных изданиях. Автор выражает искреннюю признательность и благодарность научным консультантам, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет» МЗ РФ д.б.н., доценту Салидат Магомедовне Омаровой и зав. лабораторией молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» член-корр. РАН, д.м.н., профессору Оксане Анатольевне Свитич за ценные советы на всех этапах выполнения работы.

### **Степень разработанности темы исследования**

Заболевания легких у детей многообразны: это острые и хронические, инфекционно-воспалительные и аллергические болезни, врожденная и наследственная патология. Чёткое определение отдельных нозологических форм лёгочной патологии у детей актуально для повседневной клинической практики и способствует совершенствованию диагностических и терапевтических мероприятий [25].

Развитию неонатальных пневмоний способствует большое количество неблагоприятных факторов, действующих на организм плода в анте-, интра- и постнатальном периодах. НП может быть как первичным заболеванием, так и одним из очагов сепсиса или генерализованной вирусной инфекции.

До конца 80-х гг. XX века среди возбудителей пневмонии преобладали грамположительные микроорганизмы, в первую очередь золотистый стафилококк [35; 210].

В последнее десятилетие в структуре этиологии пневмоний у новорожденных отмечается существенное отличие от структур других возрастных периодов. В этиологии неонатальных пневмоний при трансплацентарном пути инфицирования особое значение имеют цитомегаловирусная и герпетическая инфекция, краснуха, туберкулез, сифилис. При перинатальном инфицировании важная роль отводится стрептококку группы В, кишечной палочке, анаэробным бактериям, хламидиям, микоплазме, цитомегаловирусной инфекции. Постнатальный путь инфицирования обусловлен коагулазонегативными стафилококками, стрептококками, синегнойной палочкой, аденовирусами, цитомегаловирусами, вирусами гриппа А, В, парагриппа, РС-вирусом, кандидами, кишечной палочкой, микобактериями туберкулеза и др. [51; 73].

Возбудитель может попадать в организм новорожденного трансплацентарно или при аспирации околоплодных вод, но наиболее частым является воздушно-капельный путь инфицирования. В патогенезе НП большую роль играют несовершенство центральной регуляции дыхания, незрелость легочной ткани, наиболее выраженные у недоношенных детей, несовершенство иммунной системы [14; 35].

В неонатологической практике пневмонию подразделяют в соответствии со следующими критериями:

- *по времени возникновения*: внутриутробная (врожденная) и постнатальная (ранняя и поздняя неонатальная);
- *по этиологическому принципу*: вирусная, бактериальная, паразитарная, грибковая, смешанная;

- по распространенности процесса: очаговая, сегментарная, долевая, односторонняя, двусторонняя [69].

В большинстве работ, посвященных неонатальным пневмониям, в качестве объектов исследования используют штаммы микроорганизмов, выделенных из биоматериала от новорожденных и медицинского оборудования в чистой культуре.

В знаниях о неонатальных пневмониях имеется пробел, касающийся образования биопленок на поверхностях, как биогенного, так и абиогенного происхождения, колонизированных микроорганизмами, и, следовательно, на всех этих поверхностях закономерно формируются биопленки. Полученные данные можно использовать в качестве основы для разработки методов диагностики неонатальных пневмоний.

Вопрос о действии микроорганизмов, возбудителей НП за счет факторов патогенности на организм новорожденного и влиянии на показатели врожденного иммунитета, проблемы диагностики и антибиотикорезистентности возбудителей неонатальных пневмоний являются малоизученными направлениями современной медицинской микробиологии.

#### **Положения диссертации, выносимые на защиту:**

1. Выявлены клинико-микробиологические предикторы развития внутриутробных и ранних неонатальных пневмоний. Риск развития ВУП ассоциирован микроорганизмами семейства *Staphylococcus* (*S.epidermidis*). а РНП - ассоциирован микроорганизмами семейства *Enterobacteriaceae* (*K.pneumoniae*, *E. coli*), безводным периодом более 24 часов и асфиксией новорожденных.

1. Проведена оценка антибиотикорезистентности возбудителей неонатальных пневмоний, которая показала, что между заболеваемостью новорожденных неонатальными пневмониями и резистентностью к антибактериальным препаратам имеется умеренная положительная связь, что свидетельствует о

возможности формирования в ОРПН «госпитальных» штаммов, которые и вызывают данные инфекционные осложнения.

2. У новорожденных с пневмониями определен дисбаланс в факторах врожденного иммунитета на уровне эпителиальных клеток верхних дыхательных путей: значительное снижение экспрессии рецепторов TLR2 и TLR4 на фоне высокого экспрессионного уровня эффекторных молекул.

3. Скрининг полиморфизмов в генах *TLRs*, цитокинов и *DEFB1* у родильниц и у новорожденных обладает высокой прогностической ценностью и позволяет оценить риск развития неонатальных пневмоний, и потенциально может быть использован для дифференциальной диагностики пневмоний у новорожденных.

### **Степень достоверности и апробация результатов исследования**

Для решения поставленных задач был изучен статистически значимый размер выборки новорожденных с неонатальными пневмониями, практически здоровых младенцев, сопоставимых по полу и возрасту с использованием современных микробиологических и молекулярно-генетических с использованием сертифицированного оборудования и реактивов, при постоянном использовании контрольных тестов. Все исследования имели трехкратную воспроизводимость. Анализ полученных результатов проводили с использованием современных статистических методов на достаточном количестве наблюдений, с использованием адекватных методов статистической обработки данных с помощью сертифицированной программы.

Выносимые на защиту положения, выводы и рекомендации подтверждены фактическим материалом и отражают основные достижения соискателя по теме исследования. Вышеуказанное позволяет считать полученные результаты достоверными, а сделанные выводы обоснованными и вытекающими из результатов проведенных исследований.

Диссертация апробирована на заседании кафедры микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет» Минздрава России 11 октября 2017 года (протокол № 5).

Основные положения работы доложены и апробированы на следующих научных форумах: на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы эпидемиологии на современном этапе», Москва, 2011; XIV Международном конгрессе МАКМАХ по антимикробной терапии, Москва, 2012; IV международной научно-практической конференции «Современные концепции научных исследований», Москва, 2014; IV международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные науки сегодня», North Charleston, USA, 2014; на International scientific conference Science, Technology And Life – 2014, Czech Republic, Karlovy Vary, 2015; XIII Международном конгрессе «Современные проблемы иммунологии, аллергологии и иммуно-фармакологии», Москва, 2015; Всероссийской научно-практической конференции «Новые методы экспресс диагностики микроорганизмов в медицине, фармации, ветеринарии и экологии», Санкт-Петербург, 2015; XXI юбилейной Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы инфекционных болезней в клинике и эксперименте», Махачкала, 2016; I междисциплинарной конференции «Научно-практическая ревматология. Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания», Москва, 2016; IV Всероссийской научно-практической конференции «Антибиотикорезистентность и тактика антимикробной химиотерапии», Махачкала, 2017.

### **Внедрения результатов исследования**

По материалам диссертации изданы методические рекомендации, информационные письма. Результаты исследования использованы в создании рекомендаций по коррекции формуляров антибиотикотерапии неонатальных пневмоний и при организации мероприятий микробиологического мониторинга в родильном доме Республиканской клинической больницы. Материалы диссертации внедрены в учебный процесс, используются в лекциях и на практических занятиях при обучении студентов и врачей-бактериологов на курсах последипломного образования кафедры микробиологии, вирусологии и

иммунологии ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет» МЗ РФ.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертационная работа «Диагностика неонатальных пневмоний: клинико-микробиологические и иммунологические аспекты» соответствует формуле научных специальностей: 03.02.03 — «Микробиология» со следующими областями исследований указанной специальности по пунктам: 2 - выделение, культивирование, идентификация микроорганизмов; 3 - морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов и 14.03.09 — «Клиническая иммунология, аллергология» со следующими областями исследований этой специальности: изучение патогенеза иммунозависимых заболеваний (иммунодефицитных состояний, аллергической и аутоиммунной патологии) и разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики аллергических и иммунопатологических процессов».

### **Публикации**

Результаты проведенного диссертационного исследования в полном объеме изложены в 60 научных работах, опубликованных автором, из которых 17 работ опубликованы в изданиях, включенных в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий ВАК Министерства образования Российской Федерации и 43 работы опубликованы в сборниках материалов конференций и конгрессов. Получены Приоритетные справки на изобретение Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам (Роспатент) о государственной регистрации: «Способ диагностики неонатальных пневмоний смешанной этиологии» № заявки 2016150053/15 (080352) от 19.02.2016; «Способ прогнозирования неонатальных пневмоний» № заявки 201733564/17(059224) от 26.09.2017.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 298 страницах машинописного текста и состоит из введения, основного текста (обзора литературы, главы, посвященной описанию материалов и методов исследований, и 6 глав собственных исследований), заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы. Диссертация иллюстрирована 37 таблицами и 44 рисунками. Библиографический указатель включает 216 источников литературы, в том числе 122 ссылки на отечественных авторов и 94 ссылки на зарубежных авторов.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

## НЕОНАТАЛЬНЫЕ ПНЕВМОНИИ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ

Патология дыхательной системы является одной из основных причин высокой заболеваемости и смертности новорожденных. Инфекции, характерные для перинатального периода, в структуре причин детской смертности составляют около 30%. Среди респираторных заболеваний в неонатальном периоде пневмония занимает особое место из-за высокой частоты, тяжести курса, возможности осложнений и неблагоприятных исходов. Пневмония является важнейшей отдельно взятой инфекционной причиной смертности детей во всем мире [1; 20; 34; 151; 195].

По данным официальной статистики, в Российской Федерации за 2015 г. врожденная пневмония диагностирована у 0,98% недоношенных новорожденных с массой тела при рождении 1000 г и более и у 20,77% новорожденных от 500 до 999 г. Летальность от врожденной пневмонии доношенных новорожденных составила 1,66%, недоношенных детей, родившихся с массой тела 1000 г и более, - 2,3%, детей, родившихся с экстремально низкой массой тела, - 11,8% (форма № 32).

Пневмония является одной из форм острой респираторной инфекции, воздействующей на легкие. Это острое инфекционное заболевание преимущественно бактериальной этиологии, характеризующееся поражением респираторных отделов лёгких с внутриальвеолярной экссудацией, инфильтрацией клетками воспаления и пропитыванием паренхимы экссудатом, наличием ранее отсутствовавших клинико-рентгенологических признаков локального воспаления, не связанных с другими причинами [45; 105; 117].

Наступление самостоятельного дыхания является одним из важнейших факторов адаптации ребенка к внеутробному существованию, внутриутробной и интранатальной инфекции, а развитие воспалительного процесса является одной из основных причин высокой заболеваемости респираторными адаптационными расстройствами [116].

В мире около 1,7 миллиона случаев детской смертности связаны с пневмонией, а значительное число из них приходится на страны с низким уровнем доходов [153; 202; 141; 199]. Приблизительно 0,5-1,0% новорожденных и 10-15% преждевременных новорожденных диагностированы с пневмонией. А у новорожденных, которые находятся в ОРИТН на ИВЛ, частота пневмонии может достигать 40% [11; 45; 51].

В Российской Федерации, по данным Министерства здравоохранения, заболеваемость пневмонией у новорожденных за последние 5 лет практически не изменилась и не имеет нисходящей тенденции, составляющей до 85% (форма № 32 Постановления Росстата № 2520 от 29.12.2011).

По мнению ряда исследователей, рентгенография грудной клетки в большинстве случаев имеет невысокий диагностический уровень, хотя и является общеизвестным методом диагностики пневмонии. По их мнению, лихорадка и тахипноэ являются важными диагностическими признаками пневмонии у новорожденных [134; 190; 206].

Вместе с тем, необходимо принять во внимание, что в период новорожденности пневмония проявляется картиной дыхательных заболеваний, и клинические проявления очагового и системного воспаления могут быть выражены в незначительной степени.

По этой причине диагноз пневмонии в неонатальном периоде можно считать проверенным только в тех случаях, когда фокальное воспалительное повреждение легких подтверждается рентгенологически [69].

Согласно Н.Н. Володину, основными критериями диагностики внутриутробной пневмонии являются:

- на рентгенснимке отмечаются очаговые и / или инфильтративные тени (в первые 3 дня жизни);
- при высеве клинического материала от родильницы и новорожденного аналогичной микробиоты (материал должен быть взят в первый день жизни);

- развитие пневмонии с синдромом аспирации, в течение первых 3 дней жизни (если аспирация произошла интранатально и была подтверждена при отсасывании из трахеи сразу после рождения ребенка).

Наличие одного из этих критериев является свидетельством развития внутриутробной пневмонии [93].

Существуют некоторые различия в терминологии «врожденной пневмонии». Ряд исследователей придерживаются определения, что под пневмонией, связанной с антенатальной инфекцией, следует понимать болезни, клинически проявляющиеся в первые три дня жизни ребенка. При интранатальной инфекции ВУП также может развиваться в течение первых 72 часов жизни [35; 44; 58; 61; 69; 179]. Однако известно, что внутриутробные пневмонии могут проявляться позднее - на 4-7-й день жизни и при некоторых видах возбудителей, например, у *C. trachomatis*, в 3-6-8 недель жизни [44; 69; 116; 196].

Согласно Y. J. Wang, et al. (2008) нецелесообразно подразделять пневмонии на врожденные или приобретенные, основанные исключительно на времени появления клинических симптомов - до и более чем через 72 часа после рождения. Более целесообразно подразделять пневмонии на ранние (чаще всего врожденные), а поздние (чаще всего приобретенные) [168].

Наряду с этим эксперты ВОЗ указывают на затруднения при проведении дифференциальной диагностики между врожденной и госпитальной пневмонией при выявлении пневмонии у новорожденных в возрасте старше 2 дней, находящихся в условиях родовспомогательного учреждения [69; 116; 179].

Н.П. Шабалов [116] предлагает делить неонатальные пневмонии на:

- врожденные трансплацентарные (антенатальные);
- врожденные интранатальные пневмонии;
- неонатальные приобретенные пневмонии (в т.ч. домашние и госпитальные пневмонии).

Из последних рекомендуется выделять вентилятор-ассоциированные пневмонии, на фоне искусственной вентиляции легких.

В России принято классифицировать пневмонию у новорожденных в соответствии с ICD-10 (по этиологическому принципу) [20; 69]:

Клинические шифры в соответствии с МКБ-10

P23 Врожденная пневмония

P23.0 Вирусная врожденная пневмония

P23.1 Врожденная пневмония, вызванная хламидией

P23.2 Врожденная пневмония, вызванная стафилококками

P23.3 Врожденная пневмония, вызванная стрептококками группы В

P23.4 Врожденная пневмония, вызванная *E. coli*

(Кишечная палочка)

P23.5 Врожденная пневмония, вызванная *Pseudomonas*

P23.6 Врожденная пневмония, вызванная другими бактериальными микробами: *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella*, *Mycoplasma*, *Streptococcus*

(за исключением группы В)

P23.8 Врожденная пневмония, вызванная другими патогенами

P23.9 Врожденная пневмония, неуточненная

По данным клинических рекомендаций «Врожденная пневмония» Минздрава РФ (2017) рекомендовано использовать более емкий термин «неонатальная пневмония», сочетающий врожденные, аспирационные и приобретенные, включая нозокомиальные пневмонии новорожденных [20; 25; 31]:

Развитию пневмонии у новорожденных благоприятствует большое число неблагоприятных факторов, влияющих на организм плода в предродовой, внутри- и послеродовой периоды.

Неонатальная пневмония может быть как примордиальной болезнью, так и одним из очагов септицемии или вирусной инфекции.

### 1.1. Этио-патогенетические и клинические особенности пневмоний у новорожденных

Этиология неонатальной пневмонии является полиморфной и зависит от времени и обстоятельств проникновения инфекционного агента в легкие. В подавляющем большинстве случаев внутриматочная пневмония, возникающая в антенатальном периоде, является одним из проявлений специфического ВУИ (вирус цитомегалии, герпетическая инфекция, листериоз и т. Д.). Наличие чистой вирусной пневмонии не признается всеми авторами. Считается, что вирусы являются проводниками, которые готовят почву для прикрепления внутриклеточных патогенов [19; 98; 104; 105; 116; 139].

По мнению большинства исследователей, внутриутробная трансплацентарная (антенатальная) пневмония является проявлением генерализованного ВУИ, такого как краснуха, герпес, листериоз, микоплазмоз и т. д. Антенатальная инфекция возможна со стрептококками групп В и D, листериями моноцитогенами и т. д.

Акцентируется, что врожденные интранатальные инфекции являются результатом генитальных инфекционных заболеваний матери с соответствующей микрофлорой:

- генитальные микоплазмы (*M. hominis*, *U. urealyticum*);
- анаэробные бактерии, включая стрептококки группы В и D;
- другие микроорганизмы - зеленящие стрептококки, гемофильные и туберкулезные палочки, листерии.

Интранатальные пневмонии, приобретенные во время родов, вызывают стрептококк группы В, хламидии, *M. hominis*, *CMV*, листерии, ВПГ-2, грибы рода *Candida*, реже другие патогены - зеленящий стрептококк, эшерихии, энтерококки, трихомонады [43; 51; 69; 72; 116; 179; 196].

Приобретенная (больничные, нозокомиальные) пневмония может быть вызвана *K. pneumoniae*, *E.coli*, *S.aureus* и *S.epidermidis*, а домашняя «уличная» приобретенная пневмония чаще встречается на фоне острой респираторной вирусной инфекции (ОРВИ), вызванной аденовирусами, респираторно-

синцитиальным вирусом и т.д. с прикреплением пневмококков или гемофильного стержня [80; 103; 104; 105; 195]. Подобный видовой состав характерен для ранних вентиляторов связанной пневмонии. Поздние пневмонии, обусловлены у *P. aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *S. epidermidis* и *S. aureus*, включая метициллин-резистентные, часто в сочетании с грибами рода *Candida*, микоплазмами и *Chlamidia trachomatis* [43; 81; 89; 166].

Согласно Н.Н. Володина с соавторами (2008), если до 90-х годов прошлого века в этиологии ВУП преобладала грамположительная микрофлора, главным образом стрептококк группы В, а затем в последние десятилетия возросла значимость грамотрицательных бактерий (*Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Proteus* и т.д.) [69].

А.К. Ткаченко [108] выявил несколько типов клинического течения бактериальной пневмонии у новорожденных в зависимости от типа возбудителя:

#### ***Пневмонии, вызванные S. aureus, S. epidermidis***

Стафилококковая пневмония может иметь множество клинических вариантов. В некоторых случаях она развивается как первичное заболевание с острым началом, тяжелым и продолжительным течением. В других случаях заболевание характеризуется постепенным, продолжительным, волнообразным течением, являясь осложнением сепсиса. У новорожденных стафилококковая пневмония протекает без абсцедирования, по типу мелкоочаговой или интерстициальной пневмонии. Незирая на это, такая пневмония у новорожденных протекает тяжело, с выраженными явлениями интоксикации, с высокой температурой, цианозом, одышкой, значительным нарушением сердечно-сосудистой деятельности и увеличением печени [108].

#### ***Пневмония, вызванная стрептококками группы В***

Стрептококковая пневмония в настоящее время встречается редко, возможно, в связи с тем, что гемолитический стрептококк сохраняет высокую чувствительность к антибиотикам пенициллинового ряда. Болезнь развивается в раннем неонатальном периоде, чаще всего в первые 48-72 часа жизни. Изолированная стрептококковая пневмония регистрируется у 30-45%

новорожденных, она клинически проявляется на 5-7 день жизни ребенка и часто является одним из проявлений врожденного (внутриматочного) стрептококкового сепсиса. Для пневмонии, вызванной *S. agalactiae*, характерно сочетание воспаления в интерстициальной легочной ткани с наличием множественных ателектазов, выявляющихся на рентгенснимках грудной клетки, а также синдром дыхательных расстройств.

Стрептококк группы В (*S. agalactiae*) можно выделить из крови и спинномозговой жидкости [108].

**Пневмококковая пневмония** наблюдается чаще всего в возрасте 6 месяцев. У детей пневмония протекает с умеренным токсикозом, лихорадкой и одышкой. На рентгенснимках отмечаются полисегментарные инфильтративные изменения [108].

**Пневмония, вызванная *E. coli*, *K. pneumoniae* и другими грамотрицательными бактериями семейства *Enterobacteriaceae***, основные госпитальные пневмонии у детей. Клебсилезная пневмония отличается тяжестью течения, клинической картиной инфекционно-токсического шока. Обычно поражается вся левая часть легкого; характеризуется образованием множественных абсцессов. Аналогичная клиническая картина наблюдается при пневмониях, вызванных различными видами *enterobacteria*, *Pseudomonas Aureginosa* и *Acinetobacter*.

В развитии воспаления легких, вызванного *K. pneumoniae* или *E. coli*, важность придается микроаспирации слизи, инфицированной возбудителем из верхних дыхательных путей. Частые срыгивания у новорожденных способствуют колонизации слизистой оболочки ротоглотки бактериями [108].

**Пневмонии, вызванные *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.***

Большинство госпитальных пневмоний вызывают *P. aeruginosa* (неблагоприятный прогноз, высокая летальность) и другие, не ферментирующие грамотрицательные бактерии. По данным Российских ученых, *Pseudomonas aeruginosa* была выявлена у младенцев, умерших от РНП в 30,1% случаев; *Acinetobacter spp.* (в основном *A. calcoaceticus*) - менее 5%. Кроме того, *P*

*aeruginosa* является возбудителем пневмонии у детей, страдающих кистозным фиброзом.

Такие болезни, как правило, чрезвычайно сложны. Воспаление легких часто начинается остро, но иногда, особенно у новорожденных и недоношенных детей, возможен подострый ток. Более 50% случаев развивают инфекционно-токсический шок. Часто затрагивается доля легкого, возможно, микроабсцедирование [108].

### ***Листерийная пневмония у новорожденных***

Развитие болезни у плодов и новорожденных с пониженным иммунитетом. У практически здоровых людей листерия обычно не вызывает заболевания. Плод и новорожденные инфицированы от матерей в результате передачи инфекции при листериозе хориоамнионита или гриппоподобного листериоза беременной женщины. При антенатальной инфекции заболевание проявляется в первые 48-72 часа жизни, что приводит к развитию врожденной изолированной листерийной пневмонии или сепсиса. При интранатальной инфекции обычно встречаются изолированные менингиты, энтероколит. Листерийная пневмония у новорожденных не имеет специфических клинических и рентгенологических особенностей. Диагноз подтверждается на основании обнаружения возбудителя или его антигена [108].

### ***Хламидийная пневмония у новорожденных***

В настоящее время распространена пневмония хламидийной этиологии (8-10: 1000 новорожденных). У новорожденных, родившихся с антенатальной пневмонией, показатель по шкале Апгар составляет ниже 6 баллов.

Клинические признаки внутриутробной хламидийной пневмонии происходят в разное время после рождения - в течение 4-12 часов до 4-5 дней жизни, иногда до нескольких месяцев. Симптомы заболевания проявляются постепенно, сопровождается сухим кашлем, который в конечном итоге усиливается и становится пароксизмальным. Общее состояние не страдает. Одышка увеличивается постепенно. Обнаруживается расхождение между клиническими проявлениями пневмонии (одышка, цианоз), сравнительно легким

общим состоянием и элементарными симптомами интоксикации. Вместе с тем, у подавляющего большинства новорожденных с рождения или в первые дни жизни диагностируют гепатоспленомегалию. У 50% детей отмечается серый оттенок кожных покровов и отечный синдром II-III степени.

Клиническая картина поражения легких проявляется со временем. Скорее всего, это связано с продолжительным латентным течением и активацией инфекции под воздействием разнообразных факторов (гипотермия, перегревание, вакцинация БЦЖ, искусственное вскармливание и др.).

В мазках из верхних дыхательных путей и ТБА, обнаруживают хламидийный антиген. Пневмония протекает тяжело, нередко с летальным исходом.

У недоношенных детей хламидийная инфекция возникает на фоне тяжелого токсикоза. На 5-7-й день жизни у младенцев проявляется инфекционный токсикоз, сопровождающийся бледностью и «мраморностью» кожных покровов с выраженной иктеричностью, иногда сопровождается сыпью. Отмечается угнетение центральной нервной системы, регургитация. У большинства новорожденных наблюдается лимфаденопатия.

Обнаруживается диссоциация между выраженностью одышки и относительно недостаточными физикальными и рентгенологическими данными, появляется сухой пароксизмальный кашель (похожий на коклюш), но без повторов.

Дыхание в легких пуэрильное или несколько ослаблено, выслушиваются рассеянные крепитирующие хрипы, и возможно появление хрипов. На 2-3-й неделе заболевания появляется пароксизмальный, влажный кашель с отхождением тягучей мокроты. Кроме того, характерно сохранение фетальных шунтов плода и увеличение сердечно-легочной недостаточности. В наиболее тяжелых случаях появляется геморрагическая болезнь новорожденного или синдром-ДВС. Пневмония носит интерстициальный характер, что объясняется биологией патогена и сходством его жизненно важных функций с вирусами [108].

### ***Микоплазменная пневмония у новорожденных***

Выраженность клинических проявлений микоплазменной инфекции весьма вариабельна и может характеризоваться как субклиническим, так и манифестным течением. *M. pneumoniae* может поражать как верхние, так и нижние дыхательные пути. Инкубационный период при микоплазменной инфекции составляет около 2–3 нед.

В педиатрической практике чаще наблюдается постепенное начало заболевания. У новорожденных отмечаются катаральные явления. Наиболее ярким клиническим симптомом при микоплазменной инфекции является сухой, приступообразный, интенсивный кашель.

Микоплазменная пневмония отличается тем, что часто присутствуют внелегочные симптомы. К ним относится кожная сыпь, боль в животе, мышцах и суставах, парестезия. Сыпь выявляется у 12-15% больных детей. Она пятнисто-папулезная или уртикарная. У маленьких детей симптомы выражены слабо.

У некоторых больных заболевание имеет смешанную этиологию. В данной ситуации присоединяется вторичная бактериальная инфекция. Наиболее тяжело протекает сливная пневмония, когда мелкие очаги сливаются между собой, затрагивая несколько легочных сегментов или целую долю. У половины больных детей при пневмонии наблюдается увеличение печени. Функция органа при этом не нарушена. Реже увеличивается селезенка [108].

В литературе обсуждается важность уреоплазмы в развитии НП. Подтвержден тот факт, что передача инфекции происходит вертикальным путем. Культура *U. urealyticum* выделяется из материнской и пуповинной крови, из амниотической жидкости, ЭТГ новорожденных и из пораженных легких младенцев [144; 159; 186; 192; 194; 203; 206].

Существуют расхождения во взглядах относительно важности микоплазм в этиологии врожденной и неонатальной пневмонии [136; 151; 173]. Одни исследователи отрицают их роль, другие приводят противоположные доказательства [136; 151; 173].

Так, А.В. Цизерлинг гистологически выявил типичные признаки микоплазмоза в легких умерших новорожденных детей [112]. Н.П. Шабалов также считает, что причиной заболеваемости и летальности новорожденных от пневмонии может быть микоплазменная инфекция [116].

Авторы отмечают, что пневмонии у новорожденных с иммунодефицитами (гуморальные формы), как правило, опосредованы той же микробиотой, что и у здоровых детей, однако они протекают тяжелее и имеют склонность к рецидивам. Пневмоцистные и зачастую грибковые или вызванные микобактериями пневмонии, характерны для недоношенных новорожденных с клеточными формами иммунодефицитов [11; 21].

### ***Пневмония, вызванная грибами *Candida spp.*, *Aspergillus spp.* и *Pneumocystis carinii****

Грибы могут вызывать больничную пневмонию на фоне вторичного иммунодефицита: *Candida spp.* и *Aspergillus spp.* - у новорожденных; *Pneumocystis carinii* - обычно у недоношенных новорожденных.

Факторы риска для такой пневмонии: длительная и массивная антибактериальная терапия без профилактики грибковой инфекции. Часто заболевание начинает подходить, симптомы скудны. Одышка является наиболее распространенным признаком пневмонии. Обычно оба легких поражаются (в начале пневмоцистоза часто нет изменений на рентгенограммах). Все грибковые пневмонии характеризуются постоянным потоком, особенно если лечение начинается поздним вечером.

Инфекционный агент может проникать в тело новорожденного трансплацентарно или с аспирацией околоплодной жидкости. В возникновении пневмонии у новорожденных слабым звеном является незрелость легочной ткани, наиболее выраженная у недоношенных детей [108].

Исходя из выше изложенного, можно заключить, что с развитием пневмонии в организме новорожденных образуется «порочный круг»: респираторные расстройства вызывают нарушения в гомеостазе, что, в свой черед, это затрудняет внешнее дыхание. По обыкновению, отличительной

особенностью неонатальных пневмоний является гипоксия, гиперкапния, респираторный или смешанный ацидоз [14].

В противоположность этому проведенные исследования на кафедре педиатрии медицинского факультета Университет Menoufiya (Мину́фия), Египет получены иные данные. Были обследованы 85 новорожденных с диагнозом неонатальная пневмония. Основными возбудителями являлись золотистый стафилококк (15%), клебсиелла (8%), кандиды (6,5%), псевдомонады (4,2%), кишечная палочка (4,2%). В группе новорожденных с диагнозом ВАП (48) были выделены культуры *Klebsiella spp.* (34%), затем псевдомонады (25,5%), золотистый стафилококк (17%), кишечная палочка (17%), кандиды (6,4%). Авторы указывают на наличие наиболее важных факторов риска развития неонатальных пневмоний: недоношенность, низкий вес при рождении, длительная продолжительность ИВЛ, энтеральное питание, пупочные катетеры, дренажные трубки [126].

Грамотрицательные микроорганизмы составляли большинство культур, полученных от новорожденных, *K. pneumoniae* обнаруживалась чаще всего.

В противоположность этому, по данным Y.J. Wang et al., (2012), при микробиологическом исследовании мокроты от новорожденных видовой состав микроорганизмов, возбудителей пневмоний совершенно иной: наиболее распространенными этиопатогенами являлись *S. aureus* (21,9%), *E.coli* (19,2%), *K. pneumoniae* (19,0%) и *Enterobacter spp.* (11,4%). Авторы так же указывают на зависимость этиологии от веса новорожденного ребенка. У новорожденных с нормальным весом при рождении высеивался *S. aureus* и с низким весом - грамотрицательная флора, в частности *Klebsiella spp.* И болезнь в последнем проявилась в первые 24 часа после рождения. В более чем 50% грамотрицательные бактерии были устойчивы ко второму, третьему и четвертому поколениям цефалоспоринов.

В литературе встречаются установки на специфичный видовой состав неонатальных инфекций у недоношенных детей. Ранние инфекции у них представлены бактериемией, пневмонией, менингитом, инфекцией мочевой

системы. Они характеризуются тяжелым течением, и смертность от них достигает 40%, что в 3 раза превышает таковую у недоношенных новорожденных при отсутствии инфекции отмечается, что основными их возбудителями являются *S. agalactiae* и *E. coli* [172].

Нозокомиальной микробиотой по больше части у недоношенных новорожденных, вызываются поздние неонатальные инфекции. В 50% случаев основными возбудителями инфекций при этом являются коагулазонегативные стафилококки, *S. aureus*, энтерококки, *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.*, грибы. Установлено, что риск развития инфекции обратно пропорционален гестационному возрасту и массе тела при рождении и прямо пропорционален степени тяжести состояния новорожденного [172].

## **1.2. Проблема антибиотикорезистентности микроорганизмов, возбудителей пневмоний у новорожденных**

На сегодняшний день вызывает много вопросов и служит поводом для дискуссий - лечение неонатальных пневмоний. Рациональная антибактериальная терапия (АБТ) предусматривает не только адекватный выбор лекарственного средства, но и способ его введения и дозы с целью эффективного лечения новорожденных.

Одним из ведущих элементов в системе противоэпидемических мероприятий, направленных на профилактику перинатальных инфекций, является мониторинг возбудителей инфекций и их антибиотикорезистентности. Знание основных тенденций формирования антибиотикоустойчивости УПМ, необходимо при выборе адекватных препаратов для конкретного новорожденного, а также при разработке программ эмпирической антибактериальной терапии в конкретном стационаре.

Концепция рациональной антибактериальной терапии предусматривает и сдерживание такой глобальной проблемы, как развитие резистентности микроорганизмов к антибиотикам. Устойчивость к антимикробным препаратам

представляет собой естественную биологическую реакцию, которая возникает как результат естественного отбора для сохранения жизнеспособности микробной популяции и может быть природной или приобретенной [100; 109].

Первый вид устойчивости характеризуется отсутствием у микроорганизмов мишени для действия антимикробного препарата или ее недоступностью. Приобретенная устойчивость возникает в результате воздействия на микроорганизмы антимикробных препаратов, особенно в их низких концентрациях, путем возникновения мутаций хромосомной ДНК или в результате горизонтального переноса генов устойчивости [165; 208].

Неоправданное и нерациональное назначение и использование антибактериальных средств, в особенности, при локализованных инфекциях, продолжает вести к все более и более стойкой резистентности (Глобальная стратегия ВОЗ по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2) [27].

Проблема антибиотикорезистентности среди клинически значимых микроорганизмов уходит своими корнями в сложные экологические и эволюционные отношения между самими микроорганизмами, сложившиеся задолго до появления человека как биологического вида. Несмотря на значительные успехи клинической микробиологии, этиотропная терапия, по крайней мере, на начальном этапе остается эмпирической, основой режимов которой являются данные о природной чувствительности к антибактериальным препаратам наиболее вероятных возбудителей. Однако проблема значительно осложняется распространением, как во внебольничных, так и особенно в госпитальных условиях приобретенной резистентности [15].

Лекарственная устойчивость возбудителей инфекционных заболеваний имеет огромное медицинское и социально-экономическое значение, связанное с использованием новых более дорогостоящих препаратов, а также увеличением сроков лечения пациентов. Поэтому поиск путей преодоления лекарственной устойчивости микроорганизмов представляет собой актуальную проблему [15].

Одной из причин избыточного назначения антибактериальных препаратов в акушерских стационарах является гипердиагностика врожденных инфекций, отсутствие четких диагностических критериев смешивание понятий «инфицирование» и «инфекция», а также желание замаскировать этим диагнозом у ребенка госпитальную инфекцию [34].

По данным Н.Н. Володина и соавт., (2008) все более широкое применение цефалоспоринов III поколения на этапе родильного дома и увеличение частоты тяжелых госпитальных инфекций у новорожденных сопровождается тенденцией к сокращению длительности курсов лечения антибиотиками группы цефалоспоринов (в связи с их недостаточной эффективностью) и увеличением частоты случаев применения антибиотиков крайнего резерва (фторхинолонов и карбапенемов) на этапе реанимации новорожденных в педиатрических стационарах [20].

Целевых исследований по этому поводу в Российской Федерации практически не проводилось, но указания на проблемы в назначении и использовании лекарственных средств, в том числе антибактериальных, у детей в клинической практике, встречаются в печати довольно часто [118, 150, 151, 265]. При этом акцент делается или на существующую практику необоснованного назначения или на использование препаратов неадекватных возбудителю.

Лечение пневмонии включает в себя комплекс мероприятий, направленных на создание оптимальных условий выхаживания (комфортный микроклимат), коррекцию дыхательных нарушений, воздействие на этиологический фактор и ключевые звенья патогенеза. Определение этиопатогенов неонатальных пневмоний имеет решающее значение для этиотропного лечения [51, 189, 196].

Одной из важнейших проблем этиотропной терапии неонатальных пневмоний является изменчивость этиоструктуры заболевания и свойств микрофлоры. Большинство исследователей и по рекомендации ВОЗ новорожденные дети с диагнозом очень тяжелой пневмонии должны немедленно госпитализироваться с назначением эмпирической антибактериальной парентеральной терапии. Но мнения исследователей о выборе антибактериальной

терапии противоречивы. Так в карманном справочнике, согласно последним публикациям, эффективно лечение оксациллином плюс цефалоспорины 3-го поколения (цефтриаксоном) [74, 174, 175, 180, 209].

Проспективное рандомизированное клиническое исследование детей в возрасте до 5 лет с диагнозом тяжелой НП, так же показало большую эффективность лечения по схеме оксациллин / цефтриаксон, чем амоксициллин /клавулановая кислота [170]. Однако ряд исследований связывают цефалоспорины 3-го поколения с повышенной распространенностью бета-лактамазной бактерии (БЛРС), повышением смертности, удлинением пребывания детей в стационаре и более высокими расходами больницы [122, 129, 155].

Проведенное рандомизированное исследование в Чили при лечении внебольничных пневмоний с использованием таких препаратов как эритромицин, азитромицин, амоксициллин наилучший эффект наблюдался при использовании азитромицина [137]. В то же время отмечают, что появление новых поколений антибиотиков сопровождается немедленным возникновением новых устойчивых штаммов микроорганизмов [35, 51].

Поэтому в ряде случаев вместо обычной рутинной этиотропной терапии в последнее десятилетие стали применять «деэскалационную» антибиотикотерапию. Стартовой терапией рекомендуются мощные и эффективные антибиотики с последующим переходом на антибиотики направленного узкого спектра после получения бактериологических анализов.

По мнению Н.П. Шабалова (2006) стартовыми антибиотиками могут быть карбапенемы, цефалоспорины 3-4-го поколения в сочетании с аминогликозидами, или фторхинолоны с карбапинемами [116].

Альтернативой при пневмонии, вызванной *Pseudomonas aeruginosa*, может стать комбинация цефалоспоринов 3-го поколения с аминогликозидами: цефтазидима и нетилмицина. При пневмонии, вызванной метициллин-резистентными штаммами грамположительных кокков, назначают ванкомицин внутривенно. В качестве альтернативы можно использовать линезолид внутривенно.

При пневмонии, вызванной хламидиями и микоплазмами, показана внутривенная медленная инфузия эритромицина. При критическом ухудшении состояния вследствие развития нозокомиальной пневмонии неустановленной этиологии на фоне предшествующей эмпирической антибактериальной терапии в исключительных случаях по жизненным показаниям используют имипенем+циластатин внутривенно [117].

Основанием для назначения АБТ у новорожденных должны быть гнойно-септические заболевания — бактериальный сепсис, внутриутробная пневмония, менингит. Многоцентровые исследования, проведенные в последние годы, показали, что профилактическое назначение АБП новорожденным при катетеризации центральных сосудов, проведении искусственной вентиляции легких (ИВЛ), мекониальной аспирации и т. д. не рекомендуется [216].

### **1.3. Роль бактериальных биопленок в развитии неонатальных пневмоний**

Впервые о роли бактериальных биоплёнок в формировании инфекций различной локализации заговорили более 25 лет назад. В настоящее время считается, что более 65% всех инфекционных заболеваний обусловлены микроорганизмами, существующими в форме биоплёнок [9; 15].

Биопленка (англ. biofilm) – это высокоорганизованные, подвижные, непрерывно изменяющиеся гетерогенные сообщества, которые состоят из активно функционирующих клеток, так из покоящихся форм, заключенных в экзополимерный матрикс [9; 59; 160].

Для большинства бактерий состояние биопленки является базовым, выработанным в течение миллионов лет под влиянием естественного отбора в меняющихся экологических условиях.

Образование биопленок – один из факторов патогенности микроорганизмов. Заключенные в матриксе синтезированных ими внеклеточных полимерных веществ, микроорганизмы имеют измененный фенотип, проявляющийся другими параметрами роста и экспрессии специфических генов. Бактериальные биопленки

могут быть образованы бактериями одного или нескольких видов и состоять как из активно функционирующих клеток, так и из покоящихся или некультивируемых форм [9; 55].

В цикле формирования биопленки, представленного на Рисунке 1, выделяют 4 стадии с общими особенностями, независимо от типа микроорганизмов:

1. Стадия адгезии;
2. Стадия необратимого связывания с поверхностью;
3. Стадия созревания;
4. Стадия распространения [120].

При низком содержании питательных веществ, клетки способны покидать биопленку и переходить в планктонную форму, что называется *дисперсией* (выброс бактерий). В результате дисперсии от биоплёнки периодически отрываются отдельные клетки, способные через некоторое время прикрепиться к поверхности и образовать новую колонию. Внутри зрелых биопленок выделяют популяцию персистеров.

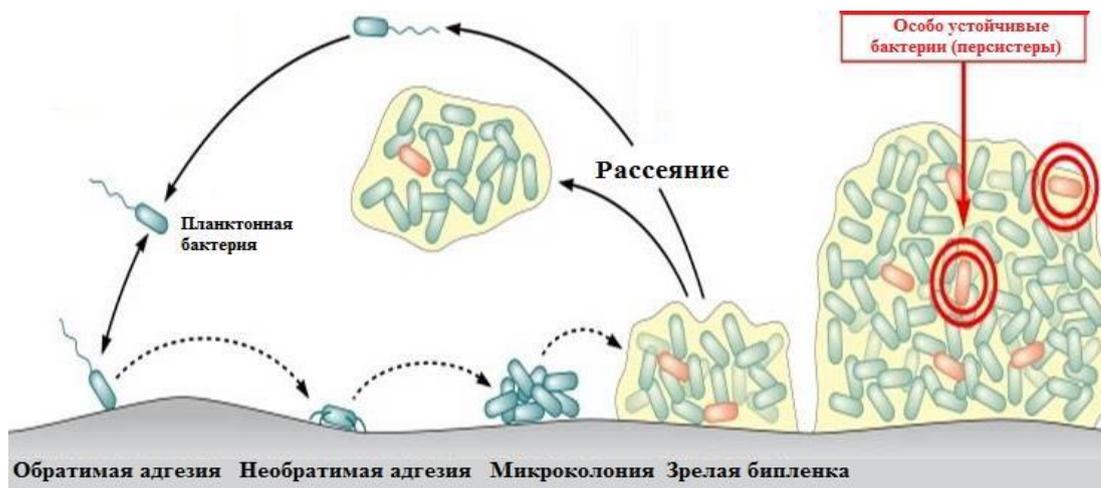


Рис.1 Стадии формирования биопленок [D. Lebeaux et al., 2014]

В связи с большей агрессивностью патогенных микроорганизмов по сравнению с комменсалами происходит преимущественное заселение ими любых

инородных тел, вводимых в организм человека. Формирование биопленок возможно на изделиях медицинского назначения, таких как катетеры, эндотрахеальные трубки, внутриматочные спирали, контактные линзы и др. [9; 160].

Их можно обнаружить в любом месте, где существуют благоприятные условия для колонизации. [30; 163]. В наибольшей степени адгезии микроорганизмов способствуют полиэтиленовые и поливиниловые устройства, в наименьшей – силиконовые, тефлоновые и полиуретановые, однако до настоящего времени не существует материалов, применение, которых одновременно было безвредно для макроорганизма и исключало бы биологическое обрастание [30].

Это является этиопатогенетической основой развития так называемых девайс-ассоциированных инфекций.

В настоящее время установлено, что биопленки являются основным фактором патогенеза заболеваний, характеризующихся хроническим воспалением [9; 107]. Хронические инфекции принципиально отличаются от острых образованием биопленок, а фагоциты макроорганизма не способны поглощать биопленки в отличие от отдельных бактериальных клеток [212].

Всё больше накапливается доказательств, что выделенная чистая культура бактерий совпадает с биопленкой только по небольшому числу свойств. Когда бактерии переходят от планктонного фенотипа к формированию биопленки, процессы их биосинтеза радикально меняются. Клетки начинают синтезировать полимеры, защищающие их и связывающие между собой и с подлежащей поверхностью. Кроме того, клетки (даже разных видов) обмениваются между собой информацией с помощью феромонов и других сигнальных молекул. Скоординированная активность сообщества микробов делает биопленки малоуязвимыми для факторов защиты макроорганизма [86].

Микроорганизмы в биопленке формируют единую генетическую систему в виде плазмид – мобильных кольцевых ДНК, несущих поведенческий код для членов биопленки, определяющих их трофические, энергетические и другие связи

между собой и окружающей средой. Последнее называют «Quorum sensing» (QS), или социальным поведением микроорганизмов. QS - это процесс коллективной координации экспрессии генов в популяции бактерий, опосредующий специфическое поведение клеток [26]. Считается доказанным, что социальное поведение микробов биопленки повышает вирулентность и патогенность всех возбудителей [55; 86].

Механизм работы QS основан на сложной иерархической регуляции целевых локусов генома бактериальной клетки. При этом регуляция осуществляется на разных уровнях воздействия: транскрипционном, трансляционном, посттрансляционном. На конкретный клеточный сигнал клетки в популяции отвечают специфическим ответом. На сегодняшний день установлено, что клеточно-клеточные взаимосвязи влияют на внутрипопуляционную дифференцировку клеток, на экспрессию генов вирулентности, регулируют ростовые процессы, характер и направление подвижности (таксис), а также бактериальный апоптоз и токсинообразование. Работу QS можно сравнить с гормональной регуляцией функциональной активности различных органов и тканей в многоклеточном организме. Грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы используют различные сигнальные системы и разные химические передатчики сигналов. Из многочисленных свойств биопленки клиническое значение имеют высокая устойчивость к факторам естественной резистентности организма, к разнообразным внешним воздействиям, к антибактериальным средствам [9; 36].

Показательно, что образовывать биопленки могут как грамположительные (*Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus viridans*), так и грамотрицательные (*E.coli*, *K.pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.* и др.) бактерии. Формировать биопленки в организме человека способны патогенные, условно-патогенные и непатогенные микроорганизмы, а также их ассоциации [26].

Существование бактерий внутри биопленок обеспечивает им много преимуществ по сравнению с отдельными клетками. Бактерии в биопленках

обладают повышенной выживаемостью в присутствии агрессивных веществ, факторов иммунной защиты макроорганизма и антибактериальных препаратов. По некоторым данным, до 80 % микроорганизмов при биопленочной инфекции бывают мультирезистентными [26].

Наличие биопленок приводит к тому, что традиционные методы микробиологической диагностики выявляют не все микроорганизмы, участвующие в инфекционном процессе. Новейшие молекулярные, геномные, транскрипционные и протеомные методы позволили определить, что при выделении чистой культуры определяется лишь около 1% клеток патогенного микробиоценоза. В результате лечение нацелено лишь на 1-2 вида бактерий из множества штаммов, присутствующих в составе биопленки (в том числе, возможно, и грибов) [145; 212].

Идентифицировать микроорганизмы в составе биопленок позволяют такие современные молекулярные методы, как электрофорез в геле и высокоэффективная жидкостная хроматография с флуоресцентной гибридизацией *in situ*, эпифлуоресцентная микроскопия, сканирующая электронная микроскопия, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой и другие исследования [145; 212].

Из многочисленных свойств биопленки клиническое значение имеют высокая устойчивость к факторам естественной резистентности организма, к разнообразным внешним воздействиям, к антибактериальным средствам [9; 36].

Существование бактерий внутри биопленок обеспечивает им много преимуществ по сравнению с изолированными клетками. Для практической медицины особенно важно, что бактерии в биопленках обладают повышенной выживаемостью в присутствии агрессивных веществ, факторов иммунной защиты и антибиотиков. Бактерии и грибы в биопленках выживают в присутствии антибиотиков в количествах в 500-1000 раз больших, чем их минимальная подавляющая концентрация *in vitro* (МПК) [9].

Бактерии в биопленках остаются живыми даже в присутствии антибиотиков, добавленных в количестве в 500–1000 раз большем, чем их минимальная подавляющая концентрация [142].

Применение антибиотиков, плохо проникающих в биопленку, очень быстро приводит к формированию и отбору устойчивых микроорганизмов. Неполная эрадикация микроорганизмов при биопленочных инфекциях в свою очередь способствует их персистенции и формированию хронических процессов.

Значительная резистентность к антибиотикам микроорганизмов в составе биопленок по сравнению с планктонными формами обусловлена способностью бактерий накапливать в матриксе внеклеточные ферменты, разрушающие антибиотики и химиотерапевтические препараты, и агрегационной природой биопленок, связанной с уменьшением площади открытой поверхности клеток, что приводит к их физической недоступности. Также особую роль играет резистентный фенотип клеток и сниженный метаболизм микроорганизмов в биопленке, который достигается за счет их многослойной топографии и приводит к снижению антибиотикочувствительности. Строение биопленок идеально способствует процессам обмена генетической информацией, в том числе резистентности к антимикробным химиопрепаратам, за счет тесного контакта и стабильной пространственной локализацией клеток. Исследования *in vitro* показали, что уровень конъюгации в биопленках гораздо выше, по сравнению с планктонными формами бактерий [9; 26].

#### **1.4. Особенности иммунной системы новорожденных в норме и при патологии дыхательной системы**

Вне всякого сомнения, иммунологическая связь родильницы и плода складывается в рамках единой функциональной системы мать-плацента-плод. Отступление от нормальных взаимоотношений в этой системе является центральным составляющим патогенеза разного рода патологий, как матери, так и плода, в большей степени определяют течение перинатального периода [21].

Точно так же как и в других системах, организация иммунной системы подвергается возрастным изменениям. Период внутриутробного развития у плода характеризуется формированием системы Аг МНС, органов иммунной системы, популяции иммунокомпетентных клеток и системы комплемента. Иммунная система родильницы толерантна к аллоантигенам плода, так как их число сравнительно невелико, а также в виду избирательной проницаемости плаценты и наличия в крови матери и плода, различных иммуносупрессивных факторов ( $\alpha$ -фетопротеина, эстрогенов, прогестерона, простагландинов и т.д.) [18; 21].

Иммунная система у новорождённых структурно организована, но функционально несостоятельна. Снижено содержание компонентов комплемента, IgG, IgA и основных популяций иммунокомпетентных клеток. На проникновение инфекционных агентов лимфоидные органы отвечают гиперплазией, проявляющейся лимфаденопатией [18].

Несмотря на парадоксальность данных об иммунобиологической реактивности новорожденных, детей первых месяцев и первых 2 лет жизни, в целом можно считать, что у детей раннего возраста имеются признаки «физиологического иммунного дефицита». Общая система специфической защиты у детей данной возрастной группы характеризуется пассивным характером иммунитета против ряда инфекций, обеспечиваемого материнскими антителами [35].

Иммунная система, будучи интегративной, определяет выживаемость младенца и является одним из наиболее отзывчивых и регулирующих функций систем гомеостаза в развитии патологических процессов и особенно в постнатальной адаптации. [68; 71].

В то же время большинство исследований базируется на изучении индивидуальных связей иммунитета [24; 35; 54]. Невозможно точно оценить сложную взаимосвязь между иммунными процессами и не дает единодушного мнения по многим аспектам иммунного ответа младенца [7].

Известно, что иммунная система новорожденных формируется на последних стадиях внутриутробного развития и в первые месяцы жизни ребенка,

поэтому иммунная система здорового ребенка значительно отличается от иммунной системы взрослого человека. Любой дестабилизирующий эффект, который приводит к аномалиям во время беременности, сокращению беременности, гипотрофии и гипоксии, приводит к задержке в развитии иммунной системы детей и дефициту защитных факторов, что, в свою очередь, увеличивает риск соматических, иммунных и неврологических расстройств новорожденных, а также уровень здоровья ребенка в более поздние годы жизни [50].

Реакции иммунной системы организма ребенка неоднозначны в развитии воспалительного процесса в легких, в зависимости от многих факторов и, прежде всего, от способности организма оказывать сильный или слабый иммунный ответ на вирусно-бактериальный или бактериальной агрессии. Некоторые дети проявляют «иммунологический паралич» по отношению к определенным бактериальным агентам, другие проявляют неактивность к тем же антигенам - своего рода толерантность. Для таких детей риск развития острой пневмонии минимален, и если он развивается, то нет явных нарушений иммунитета. Часть сенсibilизированных детей образует гипериммунный ответ, острая пневмония возникает с выраженным аллергическим компонентом. Если отказаться от вышеуказанных условий, реакция иммунной системы ребенка должна соответствовать типичной картине: увеличение функции b-лимфоцитов, мобилизация гуморального и клеточного иммунитета, изменение первичной реакции на вторичную в форме увеличения титра антител класса G. Некоторое ингибирование функций T-клеточного иммунитета является временным, и может быстро и спонтанно устраниться. К сожалению, такие «идеальные» реакции обычно не являются постоянными, они скорее исключение, поскольку почти у каждого маленького ребенка, имеющего острую пневмонию, нет ни одного, а чаще всего нескольких факторов, повышающих риск неблагоприятного течения заболевания [35].

Отсутствие гуморального и клеточного иммунитета, незрелость барьерных функций кожи и слизистых, наличие так называемого "физиологического

иммунного дефицита" как одного из значимых факторов риска реализации пневмонии у новорожденных. Общая система специфической защиты детей этой возрастной группы характеризуется пассивным иммунитетом от ряда инфекций, обеспечиваемого материнскими антителами. Имеются данные, что существуют также значительные отклонения в гуморальном звене иммунитета. Уровни IgA в крови младенцев крайне низки [35; 54; 77].

Контакт детей первых месяцев жизни с различными антигенами проявляется как первичный иммунный ответ через увеличение синтеза IgM. Антитела, относящиеся к классу IgM, не проникают через плаценту, что объясняет недостаточную защиту новорожденного от грамотрицательных микроорганизмов (*E.coli*, *Salmonella*). При острой пневмонии в первые месяцы жизни, преобладает снижение уровня IgA и IgG в крови при сохранности IgM, и даже увеличение его концентрации. Отмечается, что одной из отличительных особенностей гуморального иммунитета при острой пневмонии является повышение уровня ЦИК и появление антипролиферативных антител [54].

Многочисленные исследования показывают, что иммунный статус младенцев в неонатальном периоде и в первые годы жизни, а также патология, выявленная у них при рождении, во многом связаны с особенностями беременности у их матерей, а именно с патологией у матери-плаценты-плода - младенца. Так, в литературе имеются данные, что у новорожденных, рожденных от матерей с отягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом (ОАГА), наблюдается относительное и абсолютное снижение количества Т - и В - лимфоцитов, снижение уровня IgG, увеличение концентрации IgM, по-видимому, связанное с внутриутробной инфекцией детей, и появление следов IgA и IgE (последнее говорит о сенсibilизации новорожденных, чем является продуктом независимого синтеза иммунной системы детей) [35].

Есть особенности в клетках иммунитета. Отмечается, что у детей в течение первых 2х лет при первичных иммунных ответах В-клетки, несущие иммунологическую память, не дифференцируются. У большинства пациентов

(более 70%) со сложной фокальной или сегментарной пневмонией обычно развивается вторичная иммунологическая недостаточность [1; 131; 181; 191].

Ю.Л. Мизерницкий и др. (2005) обращают внимание на недостаточность Т-лимфоцитов при острой пневмонии у новорожденных, в основном из-за Т-лимфоцитов - помощников. В свою очередь, реанимация, прежде всего, длительная искусственная вентиляция легких и катетеризация основных сосудов, создают условия для микробной агрессии [95].

В условиях острой пневмонии наблюдается функциональная недостаточность альвеолярных макрофагов и снижение фагоцитарной активности нейтрофилов крови. У новорожденных снижены реакции бластной трансформации лимфоцитов, цитотоксическая активность Т-лимфоцитов и естественных киллеров. Установлено, что в первые дни и месяцы жизни преобладает супрессорная активность иммунной системы. Активность Т-лимфоцитов помощников низкая. Особенностью регуляции межклеточного взаимодействия у детей новорожденного периода является недостаточный синтез интерлейкинов и иммунного  $\gamma$ -интерферона. Физиологический дефицит интерферонов определяет в первые недели жизни слабую противовирусную защиту и недостаточность активности природных киллеров. Для этого возрастного периода характерно несовершенство макрофагальной системы. Отмечается, что хемотаксис и спонтанная миграция фагоцитов, как и процессы эндоцитоза, ограничены.

В последнее время интерес исследователей и практиков во всем мире было сосредоточено на комплексе проблем, связанных с изучением развития иммунной системы в норме и ее функционированием при патологических состояниях в перинатальном периоде и в раннем детском возрасте [78].

Для формирования иммунной системы внутриутробный период уникален и не соизмерим с каким-либо другим возрастным периодом. Созревание, пролиферация и дифференцировка лимфоцитов, продуцирование антиген-распознающего репертуара, формирование иммунного ответа, иммунологическая память, цитотоксичность и феномен иммунологической толерантности, которые

возникают у новорожденных, не являются полным списком основных событий, происходящих в перинатальном периоде и в раннем возрасте [18].

Характер внутриутробного развития плода и период новорожденности значительно определяет будущее состояние здоровья ребенка и качество жизни. Иммунная система интегрируется и, наряду с центральной нервной системой и эндокринной, участвует в поддержании гомеостаза организма ребенка и констатации оптимального баланса во взаимоотношениях с окружающей средой. Иммунные механизмы участвуют в патогенезе основных заболеваний перинатального периода и во многом вызывают возможность полной реабилитации больного ребенка [21].

Известно, что состояние иммунной системы здорового младенца отличается от взрослого. Из стерильных условий внутриутробного развития младенец переходит в мир, где большое количество ранее неизвестных экзогенных антигенов вирусной, бактериальной и грибковой природы угрожают ему с первой секунды жизни и даже во время родов. Кроме того, если у младенца была пренатальная патология, у него была хроническая внутриутробная гипоксия или острая асфиксия при родах, доказано, что в случае умеренных и тяжелых форм перинатального повреждения центральной нервной системы из-за нарушения проницаемости кроветворной системы, мозговой барьер, кровь получает свои собственные, эндогенные антигенные барьерные органы головного мозга, на которые реагирует иммунная система. Это может привести к развитию аутоиммунных реакций [101].

Природа распорядилась, так, чтобы состояние иммунной системы новорожденного ребенка не было, собственно, иммунодефицитным. Большинство существующих механизмов всего лишь направлено на сдерживание излишка и постепенное формирование адекватного иммунного ответа [101]. Иммунная система младенца имеет свои особенности [101; 185]:

- плод синтезирует собственные полиреактивные IgM антитела. В-лимфоциты новорожденного с CD 5 + фенотипом способны синтезировать подклассы IgG1 и IgG3, но не IgG2 или IgG4, к которым относятся антитела к

капсульному бактериальному полисахариду. Плод получает основное количество IgG от матери трансплацентарно, начиная с 35-й недели гестации. При этом IgG2 слабо проникают через плацентарный барьер [101; 185].

- в репертуаре В-клеток новорожденного ребенка преобладают незрелые В-лимфоциты. Их фенотип характеризуется высоким уровнем экспрессии поверхностной молекулы sIgM и отсутствием sIgD, тогда как у большинства взрослых В-лимфоцитов sIgD преобладает, и имеется лишь небольшое количество sIgM [101; 185].

У младенцев связывание антигена с поверхностью sIgM приводит к апоптозу незрелых В-лимфоцитов, поскольку оно не связано с инозитолфосфолипидом путем трансдукции сигнала внутри клетки.

- В - лимфоциты новорожденных лишены второго сигнала при взаимодействии с неонатальными Т-клетками, поскольку для них характерен чрезвычайно низкий уровень экспрессии CD40-лиганда (CD40L). В свою очередь, это уменьшает способность В-лимфоцитов к изотипическому переключению классов иммуноглобулинов и способность Т-лимфоцитов дифференцироваться в хелпер I типа T1 (Th1), тем самым усиливающие реакции макрофагов [101; 185].

- отсутствие взаимодействия CD40-CD40L может привести к преимущественно непрофессиональному представлению антигенов Т-лимфоцитам, поскольку нарушается экспрессия молекул В-7 на антигенпредставляющих клетках (АРК) [101; 185].

Отношение числа профессиональных и непрофессиональных клеток, которые представляют собой антиген к наивным Т-лимфоцитам, распространенным у новорожденных, влияет на результат иммунного ответа на антиген: закончится ли он праймингом или толерантностью.

- однако в периферической крови младенца также имеется небольшое количество зрелых В-лимфоцитов, которые имеют достаточное количество sIgD на своей поверхности. По этой причине, низкие дозы антигенов, вводимых новорожденным, могут быть достаточными только для прайминга зрелых, дифференцированных В-лимфоцитов, что вызывает гуморальный ответ. Если доза

антигена превышает определенный порог, большинство незрелых В-предшественников умирают от апоптоза, а анергия развивается у зрелых [101; 185].

- субпопуляция Т-лимфоцитарного хелпера CD-4 + является гетеропатогенной. У новорожденных в ней преобладают наивные непримированные Т-лимфоциты с фенотипом CD45RA +, которые действуют как индукторы супрессорных механизмов, преимущественно являясь продуцентом интерлейкина-2 (80% необработанных Т-лимфоцитов у новорожденных, по сравнению с 50% у взрослых). Более того, доля этих непримированных Т-индукторов значительно выше в пуповинной крови новорожденных, перенесших хроническую внутриутробную гипоксию (прогрессирует до 90-92%) [101; 185].

Заболеваемость и летальность новорожденных от инфекционных заболеваний обусловлены как от свойств патогена, так и от рациональной антибактериальной терапии, а также от функции иммунной системы. Онтогенетические особенности иммунной системы новорожденного одновременно делают его уязвимым, нарушая защитные реакции и возникновение инфекционных заболеваний [21; 76].

Такие свойства факторов защиты уже присутствуют при рождении. Кроме того, в ранний период адаптации на первой неделе жизни наблюдаются кардинальные изменения в гемограмме. Явление получило название первый физиологический (лейкоцитарный) перекрест. Это отражает процессы иммунологической реструктуризации, происходящие в организме новорожденного.

Подавляющее большинство авторов считают адаптацию реакцией стресса. То есть комплекс гематологических и иммунологических изменений является проявлением неонатального стресса [21].

Для проведения оптимальной иммунологической оценки у новорожденных, элементарной по затратам времени, числу заданий и экономических затрат на их реализацию можно считать, что наиболее распространенными в клинической

практике инфекционных заболеваний будут отмечаться несколько основных клинико-иммунологических синдромов [76]:

- Избыток функции моноцитов и макрофагов на клинике характеризуется гиперэргическим выражением системной воспалительной реакции, гипертермией, молниеносным сепсисом, развитием полиорганной недостаточности и септического шока, высоким риском развития деструктивных изменений в органах и тканях, таких как деструктивная пневмония, остеомиелит, некротические изменения и т. д. [76].
- Синдром дефицита моноцитарно-макрофагальной функции клинически будет характеризоваться гипоэргическими проявлениями системного воспаления, долгим течением инфекционного заболевания, плоской кривой веса, отсутствием температурной реакции и т.д. [76].

### **1.5. Механизмы ускользания бактерий от иммунных реакций организма новорожденного**

Иммунная система - это подсистема, объединяющая органы и ткани, которая защищает макроорганизм от болезней, идентифицирующая и уничтожающая опухолевые клетки и патогены, которая распознает различные патогены: от вирусов до паразитических червей и отличает их от биомолекул собственных клеток [46].

Благодаря широкому внедрению молекулярной биологии недавно был проведен ряд открытий в области взаимодействия патогенов и иммунной системы хозяина. В то же время существует интерес к факторам взаимодействия, вызванным микроорганизмами, с одной стороны, и иммунной системой пациента, с другой [33].

Безусловно, микроорганизмы будут продолжать существовать в организме хозяина при условии, если иммунные реакции убивают их медленнее, чем скорость, с которой они размножаются. Было обнаружено, что полное подавление иммунной защиты (т. е. наличие иммунодефицита) не является необходимым

условием для продления инфекции; довольно уклонения бактерий от иммунных реакций, либо подавления последних под влиянием различных механизмов, которые выработаны бактериями в процессе эволюции [46].

Микробы в течение продолжительного синхронизированного развития с типом хозяина приобрели множество методов, которые позволяют им сопротивляться механизмам его иммунитета, организовывать «дружественное» микроокружение и выживать в организме хозяина на протяжении всей его жизни. Итогом «динамической конфронтации живых систем» является формирование совместных отношений в системе хозяин-паразит, гарантируя жизнеспособность обоих видов [9, 127].

Такие отношения появляются как результат эволюционного отбора макро- и микроорганизмов. Пользуясь быстрым временем генерации, внедрившийся патоген создает популяцию, которая быстро реагирует на защиту хозяина как представителя одного вида. Вместе с тем выживание инфицированного человека обусловлено только присутствием полных защитных механизмов против патогена, противодействием его нападениям и причиненного им ущерба. Патоген может воздействовать на свойства иммунной системы хозяина только на уровне популяции, внося вклад в локальные области позитивного или негативного выбора аллельных модификаций или генных мутаций, которые контролируют функцию иммунитета [128].

Детерминантами патогенности у бактерий являются структуры, которые обеспечивают их удачную адгезию к слизистым, проникновение, рост, ингибирование защиты хозяина и повреждение тканей.

Детерминанты, которые препятствуют сохранению владельцев, так называемые «агрессины», имеют большое значение для долгосрочного выживания. Многочисленные агрессины являются Ag, поэтому адекватный иммунный ответ должен устранять их влияние на защиту хозяина [46].

Существует 3 основных типа патогенных стратегий в организме хозяина: «секретное присутствие» (stealth), которое позволяет патогену уклониться от мгновенной идентификации иммунной системой хозяина, «саботаж»

(повреждение механизмов иммунной защиты) и «эксплуатация», то есть использование механизмов иммунитета в их собственных интересах [128]. Каждая из этих стратегий обеспечивается рядом конкретных механизмов.

Стратегия «саботажа» содержит множество методов, которые ограничивают реакции врожденного и адаптивного иммунитета с охватом основных форм иммунной защиты - клеточного и гуморального. Собственно эта стратегия суть индуцированной патогеном иммуносупрессии, которая препятствует полной элиминации инфекционного агента в первоначальной фазе инфекции и усиливает хроническое течение. Механизмы иммуносупрессии обращают наибольшее внимание исследователей, так как они могут предназначаться, в сущности, мишенью для иммунокорректирующих эффектов [33].

Несколько вирусов успешно используют все три типа стратегии, что приводит к их постоянному сохранению в макроорганизме.

В первую очередь, это вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) и ВПГ. Вирус герпеса, в отдельных случаях, после примордиальной стадии острой инфекции, присутствует в организме человека всю жизнь и выражает высокий уровень адаптации к его иммунной системе [32].

Однако это безопасное сосуществование зависит от естественной (врожденной) и своеобразной специфической иммунной защиты, динамично противодействуя вирусному наступлению. Скрытое заражение, вызванное равновесием в системе «патоген-хозяин», немедленно заменяется проявлением инфекции в условиях ослабленной иммунной системы

Герпесвирусы могут долгое время избегать иммунного распознавания, скрываясь в завуалированном состоянии в привилегированных местах, таких как нейроны, слабо экспрессирующие молекулы HLA I вирус простого герпеса (HSV) и вирус опоясывающего лишая (VZV), или лимфоидные - вирус Эпштейна-Барр (EBV) и гемопоэтические клетки - цитомегаловируса человека (CMV).

Вирус опоясывающего герпеса заражает не только нейроны, но и Т-лимфоциты, которые обеспечивают его распространение по всему телу. Папилломавирус человека (HPV) сохраняется в кератиноцитах, отличительной

чертой которого является индукция периферической толерантности Т-клеток к антигенам, выраженным на их поверхности. Вирус Эпштейна-Барр заражает В-лимфоциты, проникая в них через CD21 – клеточный рецептор для C3d компонента комплемента [33; 194].

В недрах В-клетки EBV выбирает перmissive среду для своего обитания, чему содействует повреждение апоптоза [192]. Многие герпесвирусы (HSV, EBV, CMV) кодируют белки, которые нарушают распознавание антигена на стадиях протеолиза, транспорта и включения антигенного пептида в сайт связывания молекулы HLA I. Продукты гена CMV блокируют сборку и перенос молекулы класса HLA I на поверхность АПК, нарушают опосредованную  $\gamma$ -интерфероном экспрессию (IFN $\gamma$ ) молекул класса HLA II, а HSV подавляет экспрессию антигенов HLA класса II на нейронах [128].

Многие бактерии также используют стратегию «саботажа» или «эксплуатации» механизмов иммунной защиты, реже стратегию «секретного присутствия» [128].

Известным возбудителем тяжелой хронической инфекции является *Chlamydia spp.* имеют двойную стратегию: скрыть от реакций иммунной системы.

Постоянное присутствие этой бактерии в клеточных вакуолях повреждает или модифицирует внутриклеточные пути биосинтеза и транспорта молекул, участвующих в иммунном ответе, например, МНС II класса. Инфицирование *Chlamydia trachomatis* изменяет движение липидов из сети аппарата Гольджи и оказывает глубокое влияние на экспрессию молекул МНС II класса. [128].

Большое количество микроорганизмов «манипулируют» механизмами врожденного иммунитета [180]. Ряд кишечных бактерий выделяют продукты, включая токсины, которые изменяют процесс представления молекул АГ молекулами МНС класса II. У двух типов кишечных бактерий - *Yersinia* и *Salmonella* - есть специализированный механизм секреции III типа, который обеспечивает не только образование токсичных молекул, но и их проникновение через мембрану клетки-мишени. Токсины, продуцируемые таким механизмом,

оказывают множественное ингибирующее действие на ряд функций макрофага [128, 180].

Мощный эффект на ход инфекции оказывают суперАГ, которые синтезируются многими бактериями. Эффект суперАГ бактериального происхождения может быть двояким. Как и любой супер-АГ, они связывают молекулы МНС класса II на АПК с бета-цепным TCR для АГ, вызывая активацию и пролиферацию Т-клеток с последующей их делецией и развитием периферической толерантности к АГ патогена. Однако при массивном приеме суперАг стафилококков и стрептококков неограниченная стимуляция Т-лимфоцитов приводит к «иммунологическому хаосу», приводящему к токсическому шоку из-за чрезмерной секреции противовоспалительных цитокинов, особенно  $TNF\alpha$  и  $IFN\gamma$  [128, 184].

Капсула, которая в некоторой степени защищает клетки от иммунной системы хозяина, является важным фактором выживания некоторых бактерий. Капсулярный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* также характеризуется крайней изменчивостью.

Установлено, по крайней мере, 84 его антигенных варианта, которые нейтрализуют адаптивный иммунитет, приобретенный во время первичной инфекции [8].

Наличие капсулы не отменяет связывание бактерий в условиях высокой экспрессии клеточных рецепторов. Капсула не является абсолютным барьером для взаимодействия микроорганизма с клеткой-хозяином, поскольку высокая плотность клеточных рецепторов способствует вторжению бактерий, в том числе инкапсулированных в клетку, а факторы хозяина могут определять возможность связывания и инвазии инкапсулированных бактерий [33]. Недавно был обнаружен еще один важный механизм взаимодействия в системе патоген-хозяин - способность бактерий менять свое «поведение» в макроорганизме в соответствии от количества его популяции - так называемого «Quorum sensing». Воспринимающие белки бактерий активизируются только тогда, когда

достигается некоторая высота специальных химических сигналов, поступающих от бактерий в количестве, пропорциональном их плотности.

Активированные сенсорные белки включают транскрипцию генов факторов патогенности возбудителя, которая служит сигналом для атаки на клетки-хозяина [8]. Этот механизм, в частности, «Quorum sensing» *Pseudomonas aeruginosa*, считается новой мишенью для антибактериальной терапии [33].

Одноклеточные грибы, паразитирующие внутри клеток-хозяев, обладают теми же способами уклонения от иммунного ответа, как вирусы и бактерии с внутриклеточной выживаемостью. Таким образом, *Candida albicans* противодействует развитию протективного клеточного иммунного ответа, индуцируя синтез IL-10 [197].

Внутриклеточные патогены, расположенные далеко друг от друга во время эволюции видов (вирусы, бактерии, одноклеточные грибы, паразиты) используют успешную стратегию уклонения от наиболее эффективного клеточного иммунитета: они ингибируют синтез IL-12, необходимый для генерации Th1 и / или стимулируют продукцию иммуносупрессивных цитокинов IL-10 и трансформировать фактор роста  $\beta$  (TGF $\beta$ ) с антигенпрезентативными клетками [33, 184, 197].

Молекулярная мимикрия является эффективным методом, который скрывает антигены патогена от распознавания иммунной системой как «чужих». Молекулярные выражения лица проводятся с различной степенью структурного сходства между антигенами микроорганизма и хозяина [210].

Кросс-реактивность Т-клеток также может возникать при полном отсутствии сходства антигенов из-за ошибочного (дегенеративного) распознавания антигенного пептида. «Дегенеративное» распознавание не является чем-то необычным, но отражает естественные ограничения специфичности связывания антигенного пептида с молекулой МНС и комплексом пептид МНС с ТКР. Изучение кристаллической структуры комплекса пептид МНС- ТКР показало, что только 20-30% общей поверхности контакта непосредственно участвует в связывании пептида МНС с TCR [210].

Конфронтация между двумя системами (возбудителем-хозяин) в процессе совместной эволюции была решена изобретением новых подходов, обеспечивающих выживание обеих сторон.

Иммунная система обладает широкими возможностями маневрирования в организации защитных реакций, восполняя недостаток одних факторов другими и управляя сложным ансамблем элементов для достижения наибольшего эффекта при наименьшей «цене» защиты.

Тем не менее, течение и исход одной и той же инфекции имеют много вариантов, в зависимости от генотипа хозяина.

Очевидно, что генетическое разнообразие некоторых важных факторов врожденного иммунитета вносит значительный вклад в развитие инфекции, влияя на ее течение и исход [33].

Таким образом, врожденная особенность того же звена сети цитокинов, с одной стороны, может стать одной из причин неблагоприятного протекания и исхода инфекции, а с другой - фактором развития воспалительной патологии.

## **1.6. Актуальные проблемы диагностики неонатальных пневмоний**

Большую роль в формировании неонатальной пневмонии отводится внутриутробным инфекциям. В подавляющем большинстве случаев врожденная пневмония, возникающая в антенатальном периоде, является одним из проявлений специфических внутриматочных инфекций (цитомегаловирус и герпетическая инфекция, листериоз и т. д.), То есть они относятся по патогенезу к вторичным пневмониям [35]. Ученые солидарны во мнении, что в последние годы частота внутриутробной инфекции плода (антенатального или интранатального) резко возросла, что связано с увеличением числа беременных женщин с очагами острых и хронических вне- и половых инфекции [2; 9; 13; 21; 69; 93; 111; 112; 116; 179].

По мнению исследователей, основной причиной смерти в неонатальном периоде в 12-46% случаев являются внутриутробные инфекции. А в структуре

детской смертности внутриутробные инфекции занимают от 11 до 61% [39; 53; 116; 207]. Термин TORCH-синдром в соответствии с первыми буквами возбудителей внутриутробных инфекций (Т-токсоплазма, О-другие инфекции, R-краснуха, С-цитомегаловирус, Н-герпес) используется для обозначения внутриутробных инфекций, которые проявляются с первого дня жизни. В последние годы группа инфекций «О» была расширена. Помимо сифилиса, листериоза, они включают хламидии, микоплазмоз, вирусные гепатиты, ВИЧ-инфекцию [69; 105; 116].

Возрастающая роль в этиологии внутриутробной микробной инфекции объясняется патогенной и условно-патогенной аэробной и анаэробной микробиотой, грамотрицательными бактериями. Исследователи связывают это с использованием антибиотиков широкого спектра действия у беременных женщин [96; 112; 122].

Большинство авторов считают, что характеристикой этиологической структуры внутриутробных инфекций являются вирусно-вирусные и вирусно-бактериальные ассоциации, поэтому обнаружение патогенов представляет определенные трудности [66; 94; 175]. Внутриутробные инфекции оказывают пагубное влияние на развитие органов и систем ребенка в антенатальном периоде и приводят к увеличению заболеваемости, смертности и инвалидности детей.

Внутриутробная специфическая инфекция резко нарушает защитные механизмы ребенка, что увеличивает частоту и тяжесть неонатальной пневмонии. Установлено, что при аутопсии у 82% мертвых плодов и преждевременно новорожденных диагностируется внутриутробные инфекции.[172; 207].

Поэтому продолжают интенсивные исследования, направленные как на профилактику, так и на диагностику внутриутробных инфекций [113; 94; 113; 172].

Исследователи отмечают, что при пневмонии все чаще обнаруживаются атипичные микроорганизмы, такие как *Ch. pneumoniae*, *M.pneumoniae*, *Legionella spp.* Распространение атипичной пневмонии не совсем понятно. Атипичные бактерии требуют специальных антибиотиков, что привело к включению в

лечение неонатальных пневмоний специфических антибактериальных препаратов [141; 151; 152; 185].

В этой связи продолжается интенсивное исследование важности атипичных микроорганизмов в развитии пневмонии у новорожденных и детей раннего возраста [69; 93; 116]. Поэтому ВОЗ отмечает значимость исследований для выявления возбудителей пневмонии у детей, поскольку это имеет решающее значение для этиотропного лечения [209].

По признанию авторов в лабораторной диагностике атипичных возбудителей пневмонии имеются сложности [44; 141; 177; 195]. Применение методов серодиагностики ограничено перекрестной реактивностью, задержкой или снижением иммунного ответа, и трудностью дифференцировать настоящую инфекцию от ранее перенесенной.

Кроме того, бактериологические исследования *Ch.pneumoniae*, *M. pneumoniae* и *Legionella spp.* являются сложными из-за особых требований к питательным средам и медленного роста этих микроорганизмов. Поэтому продолжается разработка достаточно информативных методов для выявления этиологии врожденной и неонатальной пневмонии (иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция, скрещивание нуклеиновых кислот).

Следует отметить трудности специалистов по ранней дифференциальной диагностике неонатальной пневмонии и респираторного дистресс-синдрома, который создает полипрогмазию при обследовании и лечении [42; 49; 111; 135].

Внутрибольничная неонатальная пневмония вызвана либо больничными штаммами возбудителя, обычно высокой устойчивостью к антибиотикам (*K.pneumoniae*, *Pseudomonas spp.*, *Proteus spp.*), либо микробиотой самого пациента. В последнем случае лекарственная устойчивость возбудителя соответствует противомикробному лечению, проводившемуся до развития пневмонии [115; 116].

Следовательно, данные об этиологической структуре, распространенности, патогенности микроорганизмов и их роли в возникновении неонатальных пневмоний является спорной и требует дальнейшего изучения.

Высокий уровень перинатальной смертности диктует необходимость разработки доступных критериев ранней диагностики и прогноза внутриутробных инфекций, неонатальных пневмоний у новорожденных и направленной рациональной антибактериальной терапии. Иррациональное применение быстро приводит к появлению устойчивых к большинству антибиотиков микроорганизмов [16; 135].

В последние годы интенсивно развивается новое научное направление - медицинская рискология. Как известно, на состояние здоровья, заболеваемость и летальность новорожденных детей влияет большой комплекс экологических факторов: медико-биологических, климатогеографических, техногенных, антропогенных и социальных [2; 13; 40; 55].

В настоящее время ведутся исследования по выявлению факторов риска развития неонатальной пневмонии. Это указывает на обремененный соматический и акушерский анамнез матерей, неблагоприятное состояние окружающей среды, патологический ход беременности и родов, неблагоприятные социальные условия, недоношенность и ЗВУР, снижение иммунологической реактивности новорожденного.

По словам Ю.Л. Мизерницкого (2005), наличие неблагоприятных факторов риска было обнаружено практически у всех новорожденных с диагнозом неонатальная пневмония. 84% матерей имели патологию беременности и родов, 35% детей родились преждевременно, у 54% детей была перинатальная энцефалопатия различной степени тяжести, у 12% были врожденные пороки развития, а у 4,3% была болезнь Дауна [95]. Существуют и другие факторы риска реализации пневмонии у младенцев.

Вместе с тем исследователи отмечают, что в настоящее время рахит и гипотрофия не играют заметной роли как способствующие факторы развития пневмонии. Роль хронических состояний намного выше: нервно-мышечная патология, привычная пищевая аспирация, состояния иммунодефицита, кистозный фиброз, бронхолегочная дисплазия. Риск развития пневмонии у детей с врожденными пороками сердца выше, особенно при перегрузке легочной

циркуляции. Существуют такие факторы риска развития пневмонии как низкий социально-экономический уровень, плохие жилищные условия, наличие детей старшего возраста в семье, особенно тех, кто посещает детское учреждение. Промышленное загрязнение атмосферного воздуха обычно ассоциируют с повышенной заболеваемостью пневмонией, однако при этом сложно исключить влияние комплекса других факторов риска [21; 39; 41; 45; 46; 47; 71; 77; 110; 114; 118].

Некоторые авторы считают, что пол ребенка важен для комплексной оценки состояния больного ребенка и прогноза исхода заболевания. Таким образом, имеются свидетельства того, что среди детей больных пневмонией преобладают мальчики (1,25: 2,1), у недоношенных детей в 4 раза чаще развивается бронхолит и в 11 раз пневмония [73; 149].

Считается, что мальчики чаще заболевают, чем девочки, но половые различия не превышают 20%, а мальчики часто имеют неблагоприятный исход пневмонии. У младенцев-мальчиков устойчивость к инфекционным агентам снижается, поскольку синтез иммуноглобулинов связан с X-хромосомой, поэтому у девочек в случае мутации в одной из X-хромосом возможна компенсация за счет другой, поэтому, что содержание Ig G и Ig A у мальчиков ниже, чем у девочек [73].

К факторам риска развития пневмонии относятся: наследственная предрасположенность, возраст ребенка, наличие аллергических реакций в первый год жизни [21; 80; 98; 110; 119]. Доказано, что дети старшей возрастной группы и подростки менее склонны к развитию пневмонии, в 2-3 раза реже, чем дети раннего возраста. Установлена закономерность того, что чем меньше возраст ребёнка, тем выше риск тяжелого течения и неблагоприятный исход пневмонии [45; 104; 114].

В детстве развитие патологического процесса в легких характеризуется небольшими размерами и незавершенной анатомической и физиологической дифференциацией.

Эти особенности способствуют их более тяжелому течению и высокой частоте заболеваний органов дыхания.

Физиологический ателектаз, прежде всего, нижних отделов легких развивается, прежде всего, по причине того, что у новорожденного поверхностный тип дыхания, и полного расправления легких не происходит при первых дыхательных движениях. У недоношенных детей, вследствие функционального несовершенства и незрелости дыхательного центра, а также отсутствие зрелости центральной нервной системы, дыхание имеет более поверхностный характер, отмечается продолжительный физиологический ателектаз, что создает благоприятные условия для развития пневмонии [14; 91].

По мнению исследователей, одним из бесчисленных факторов, предрасполагающих к развитию пневмонии, является несоблюдение гигиенических условий, таких как регулярное проветривание жилья, пребывание на свежем воздухе, солнце и т. д. Эти факторы включают критические жизненные и социальные условия в детских домах, из семей вынужденных переселенцев, общежитий и т. д.

Существенное значение играет также и уровень социально-экономических условий жизни семьи новорожденного, а также вредные привычки, как токсикомания, наркомания, пассивное и активное табакокурение родителей [8; 104; 117]. Так, высокая заболеваемость пневмонией среди детей раннего возраста отмечается в странах с низким социально-экономическим статусом, а летальность составляет приблизительно от 2 до 4 млн. случаев каждый год [199].

Расценивая влияние макро- и микрoэкологических факторов риска на организм новорожденного, следует принять во внимание, что все они действуют в комплексе и наслаиваются на преморбидный фон и наследственные факторы, поэтому частичный анализ не может дать полноту значимости средовых факторов на состояние здоровья, заболеваемость и смертность детей [54; 69; 115; 116].

## Заключение по обзору литературы

Анализируя вышеизложенное, следует заключить, что проблема неонатальных пневмоний остаётся одной из актуальных в современном здравоохранении вследствие тяжести течения и высокого летального исхода. Имеются противоречивые сведения в отношении этиологической структуры, особенностей клинического течения и значимых факторов риска реализации заболевания у новорожденных детей, что затрудняет раннюю диагностику и выбор оптимальной схемы лечения.

Исследования, направленные на выделение и идентификацию этиопатогенов, изучение биологических свойств выделенных штаммов микроорганизмов, анализ факторов врожденного иммунитета (TLR2, TLR4, NBD-1, NBD-2, TNF $\alpha$  и NF-kB) на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей при внутриутробном инфицировании плода и ранней пневмонии новорожденных, а также обоснование методов диагностики и лечения неонатальных пневмоний являются актуальными направлениями современной медицинской науки и здравоохранения.

Особую актуальность данная проблема представляет для Республики Дагестан в связи с сохраняющимся высоким уровнем младенческой заболеваемости и смертности, в значительной мере обусловленной неблагоприятными исходами пневмоний у новорожденных детей.

Таким образом, необходимость изучения и решения вышеуказанных проблем, обеспечивают актуальность настоящей темы, приоритетность ее цели и задач.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Общая характеристика обследованных новорожденных

Основная часть работы выполнена на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет» МЗ РФ, в лаборатории «Клиническая микробиология» ООО НПП «Питательные среды» г. Махачкала (Договор о сотрудничестве № 5 от 15 декабря 2011г.), в лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва (Договор о сотрудничестве и научных исследованиях № 56 от 19 сентября 2012).

Биоматериал от новорожденных был получен в отделении реанимации и интенсивной терапии новорожденных (ОРИТН) Родильного дома Республиканской клинической больницы (РКБ) г. Махачкала (заведующий отделением - М.Д. Джанбеков).

Госпитализация детей в ОРИТН проводилась при диагностике пневмонии с наличием следующих симптомов:

- частота дыхательных движений свыше 60 в 1 минуту;
- резкое втягивание межреберий и яремной ямки при дыхании;
- стонущее дыхание, дыхательная аритмия (апноэ, гаспинг);
- острая сердечнососудистая недостаточность;
- нарушение сознания, судороги;
- развитие легочно-плевральных осложнений (плеврит, легочная деструкция, абсцесс, пневмоторакс).

1. Клинические наблюдения проведены у 579 пар «родильница-новорожденный» различного гестационного возраста от 29 до 41 недели гестации с респираторными патологиями, находящихся на лечении в ОРИТН.

2. При формировании групп придерживались общепринятой классификации неонатальных пневмоний [45; 69; 105; 116].

3. Обследованные дети были подразделены на 3 группы: группа – новорожденные с внутриутробной пневмонией, 2 группа – новорожденные с ранней неонатальной пневмонией, 3 группа – здоровые новорожденные (контрольная).

4. Ретроспективно проведен анализ медицинской документации 150 новорожденных детей с респираторными нарушениями, отобранных методом выкопировки в период с 2011 по 2015 годы.

5. С целью определения специфичности и чувствительности диагностических критериев пневмонии у новорожденных проведена верификация 450 историй болезни новорожденных детей с диагнозом пневмония, проходивших лечение в ОРИТН Родильного дома №3 РКБ г. Махачкала.

После ликвидации проявлений дыхательной недостаточности, интоксикации, гемодинамических нарушений дети переводились в отделение патологии новорожденных для дальнейшего лечения.

Материалом для исследования послужили образцы крови, трахеобронхиального аспирата и мазки слизистой зева новорожденных, полученных сотрудниками отделения реанимации и интенсивной терапии родильного дома Республиканской клинической больницы г. Махачкала в процессе лечебного процесса и планового обследования.

### **Основные принципы исследования:**

1. Ретроспективный анализ медицинской документации по единой схеме.
2. Сравнение клинического течения беременности, родов, состояния плода и новорожденного при постановке диагноза пневмония.
3. Проведение микробиологических, иммунологических, молекулярно-генетических исследований, а также определение состояния новорожденного с помощью функциональных методов исследования.
4. Анализ полученных результатов проводили с определением степени доказательности.

5. Все исследования проводились на базе одного лечебного учреждения, для всех групп использовались одни и те же диагностические методы.

Схема исследования представлена на Рисунке 2.

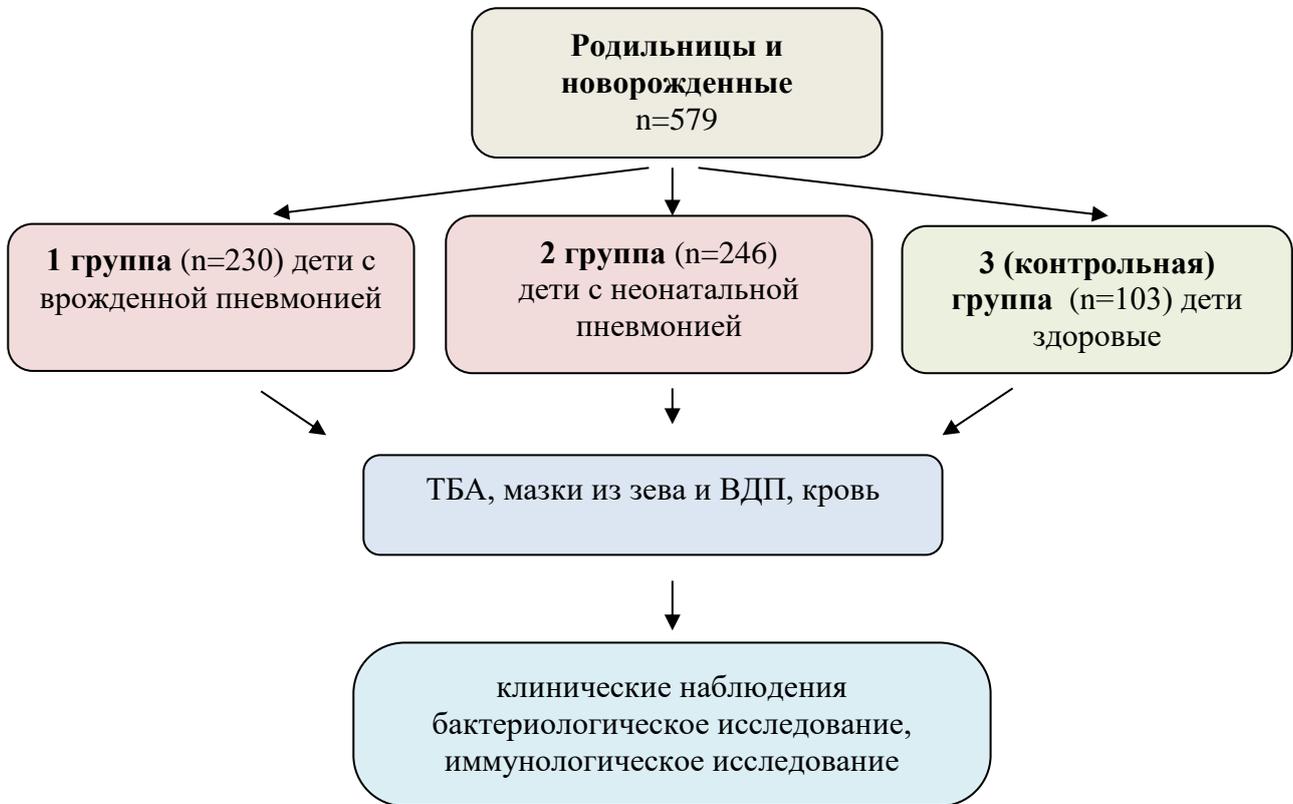


Рис. 2 Материалы и направления исследований

### Дизайн исследования

#### I этап



- отбор новорожденных поступивших в отделение ОРИТН родильного дома  
Республиканской клинической больницы г. Махачкалы

- заполнение индивидуальных карт пациентов

#### II этап



*Критерии включения в исследование:*

- новорожденные (n=476) включались в исследование, если соответствовали следующим критериям: наличие дыхательных расстройств с первых часов от рождения, потребовавших проведение респираторной терапии и, подтвержденной рентгенологическим исследованием и клиническими проявлениями пневмонии в более поздние сроки
- контрольная группа здоровых новорожденных

*Критерии исключения из исследования:*

- врожденные аномалии развития.

III этап

- в отобранных группах новорожденных сбор анамнеза, оценка объективного статуса
- заполнение индивидуальных карт наблюдения;
- результаты бактериологических исследований по определению возбудителей и определение антибиотикорезистентности
- результаты иммунологических и молекулярно-генетических исследований
- статистическая обработка материала, расчёт значений критерия  $\chi^2$ , величины относительного риска с доверительными интервалами, расчёт достоверных корреляционных взаимосвязей изученных показателей;
- анализ и обобщение полученных данных с формулировкой выводов и практических рекомендаций.

Группу сравнения составили 103 здоровых новорожденных из отделения физиологии родильного дома.

Сроки гестации, в среднем, составили  $36,8 \pm 3,36$  нед., масса при рождении -  $2900 \pm 450,5$  г.

Анализ возможных рисков развития НП изучали на основе медицинской документации 5 рожениц, в которой были отражены особенности течения

беременности, наличие в период беременности различных соматических и инфекционных заболеваний, в том числе хронических, а также результаты выполненных лабораторных исследований. Особое внимание уделяли наличию в анамнезе ИППП, а также положительных анализов на TORCH- инфекции.

Установлено, что подавляющее большинство женщин имели отягощенный акушерско-гинекологический анамнез: наличие таких возбудителей в родовых путях, как уреаплазма, хламидии, ЦМВ, ВПГ, ВПЧ, гарднерелла (43,5%). Воспалительные заболевания женской половой сферы (эндометрит, сальпингоофорит, аднексит) диагностированы у 17,6% женщин, обострение генитального герпеса - у 5,5%. У 21% женщин течение беременности отмечалось на фоне обострения воспалительных заболеваний мочеполовой системы, у 7,6% отмечалась плацентарная недостаточность, преэклампсия - у 12,6%, истмико-цервикальная недостаточность с хирургической коррекцией (швы на шейке матки) - у 13,6%, гинекологические воспалительные заболевания (кольпит, эндометрит, сальпингоофорит) у 18,7%.

У детей с диагнозом «пневмония», находившихся на лечении, в соответствии с инструкциями по забору биологического материала исследовали кровь, ТБА, мазок из зева. Забор материала от новорожденных производили соответственно в 1,3 - 5 и 7 сутки после рождения, посев осуществляли в ближайшие 2 часа после взятия.

## **2.2 Методы исследования**

Использование клиничко-анамнестического метода предполагало получение сведений на основе анализа документации: «Индивидуальной карты беременной», «Историй родов», данных из «Истории развития новорожденного» и «Истории болезни новорожденного ребенка».

У всех родильниц, дети которых, были включены в исследование, было проведено комплексное обследование, которое включало опрос (жалобы, анамнез), клиничко-лабораторное и инструментальное обследование. Клиничко-

лабораторное обследование беременных женщин проводилось согласно приказа Минздрава России № 572н от 1 ноября 2012 г. «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю акушерство и гинекология (за исключением использования вспомогательных репродуктивных технологий)» и приказа Минздравсоцразвития России № 808н от 2 октября 2009 г. «Об утверждении Порядка оказания акушерско-гинекологической помощи».

### **2.2.1. Клинические методы исследования**

Клиническое обследование новорожденных проводилось с помощью общепринятых физикальных методов с соблюдением стандартных условий.

При обследовании новорожденных учитывали оценку новорожденного по шкале Apgar (1967):

Для оценки во внимание берутся 5 основных признаков жизнедеятельности:

- A (appearance) – окрас кожных покровов
- P (puls) – частота сердцебиения
- G (grimace) – показатели рефлекторной возбудимости (мимика, кашель и т.д.)
- A (activity) – тонус мышц и активность движений
- R (respiration) – дыхательная активность

- оценку физического развития новорожденного проводили с использованием перцентильных таблиц по весо-ростовым показателям;

- оценку явлений дыхательной недостаточности проводили по шкале Даунса, представленной в Таблице 1., согласно которой дыхательная недостаточность оценивается по 5 критериям: цианоз кожных покровов, спастические движения или судороги, хрипы при дыхании, крик, частота дыхания, каждый показатель оценивался от 0 до 2 баллов.

**Шкала Даунса для оценки тяжести респираторных нарушений у новорожденных (1968)**

Признак	Оценка в баллах		
	0	1	2
Цианоз	Нет	Только при дыхании воздухом	При дыхании 40% кислородом
Спастические движения, судороги	Нет	Умеренные	Тяжелые
Хрипы при дыхании	Нет	Слышны при аускультации стетоскопом	Слышны на расстоянии
Крик	Звонкий	Глухой	Нет или еле слышен
Частота дыхания, в мин.	Менее 60	60-80	Более 80 или периодическое апноэ

*Примечание.* 4 балла в течение нескольких часов — признак легкой степени дыхательных расстройств, 5-6 — средней тяжести; 7-10 — тяжелых.

- клиническое наблюдение совместно с неонатологами (по показаниям);
- рентгенография органов грудной клетки
- лабораторное и инструментальное обследование новорожденного (по показаниям);
- по методике Сотниковой Н.Ю. оценивали степень клинической тяжести заболевания: легкая - I ст., среднетяжелая - I-II ст., тяжелая - II-III ст.).

Наличие опасных признаков у новорожденных и степени дыхательной недостаточности оценивали по «Карманный справочник. Оказание стационарной помощи детям» ВОЗ, 2012 [74].

Все больные дети имели с рождения ДН II – III степеней, нуждались в интенсивной терапии и реанимации. На основании данных анамнеза, клинической картины и лабораторных исследований им был поставлен диагноз пневмония.

На этапе пребывания ребенка в реанимационном отделении проводился контроль витальных функций мониторами «InnoCare-T». Мониторинг включал постоянный контроль электрокардиограммы, частоты дыхания и сердечных сокращений, артериального давления, температуры, насыщения гемоглобина кислородом.

По тяжести состояния проводилась респираторная поддержка новорожденных детей аппаратами ИВЛ «SECHRIST». Стартовым режимом ИВЛ у новорожденных основных групп была принудительная искусственная вентиляция легких (ИВЛ). Адаптация ребенка к респиратору проводилась за счет изменения параметров ИВЛ и седативной терапии. Выбор режима вентиляции легких осуществлялся индивидуально каждому новорожденному в соответствии с тяжестью и фазой основного заболевания.

Все пациенты в отделении находились в стандартных условиях термоадаптации. Выхаживание недоношенных новорожденных осуществлялось в кювезах I и II поколения: «ARDO Amelie», Drager.

Новорожденным из данной группы проводилась комплексная интенсивная терапия: респираторная, антибактериальная, инфузионная, парентеральное питание, посиндромное лечение. Респираторная терапия включала: оксигенотерпию, искусственную вентиляцию легких (ИВЛ), метод спонтанного дыхания под постоянным положительным давлением (СДППД).

В группе контроля у всех наблюдавшихся новорожденных при рождении состояние оценивалось как удовлетворительное, отмечалось физиологическое течение раннего периода адаптации. Они не имели соматических расстройств и были выписаны домой в удовлетворительном состоянии на 4 – 5-е сутки жизни.

В процессе наблюдения за новорожденными проводилось клиническое и лабораторное обследование, данные представлены в Таблице 2.

**Клинико-лабораторные исследования новорожденных с пневмониями  
(n=579)**

Исследования	Кол-во
Сбор анамнеза	1758
Ежедневный осмотр	1758
Рентгенография грудной клетки	1550
Бактериологический посев крови, мазков со слизистой задней стенки глотки, трахео-бронхиального аспирата	1760
ПЦР диагностика ДНК возбудителей в режиме реального времени	1760
Консультации специалистов	1460

### 2.2.2. Рентгенологическое исследование

Всем детям с подозрением на пневмонию проводилась рентгенография грудной клетки. Оценивались следующие изменения в легочной ткани: усиление, острая деформация бронхососудистого рисунка, очаговые тени. Применялась стандартная укладка.

### 2.2.3. Микробиологические методы исследования

Микробиологическое исследование трахеобронхиальных аспириатов (ТБА), мазков со слизистой зева и крови, осуществляли стандартным количественным методом в соответствии с Приказами МЗ СССР № 535 от 22.04.1985 «Об унификации микробиологических методов исследования» на широкий набор питательных сред для выделения аэробных и анаэробных факультативных микроорганизмов: Эндо - для выделения *E.coli*, ЖСА – для *Staphylococcus spp.*, ЦПХ-агар – *Pseudomonas spp.*, Кандида-агар – для выделения грибов рода *Candida spp.*, Клебсиелла-агар – для *Klebsiella spp.*, Амфолан-агар - для выделения *Proteus spp.* Культуральной диагностике всегда предшествовало микроскопическое исследование материала. Микроскопии подвергались

фиксированные мазки, а также окрашенные по Граму и метиленовым синим. Идентификацию выделенных культур микроорганизмов проводили по морфологическим, культуральным и биохимическим признакам.

Забор биоматериала производился при поступлении ребенка в ОРИТН до назначения антибиотиков в асептических условиях в заранее подготовленные стерильные пробирки и флаконы. Взятие ТБА для выполнения микробиологических исследований осуществляли путем введения в эндотрахеальную трубку 1 мл стерильного физиологического раствора с последующей аспирацией содержимого дыхательных путей. Материал собирали с соблюдением правил асептики: ТБА собирали в стерильные закрытые контейнеры, мазки со слизистой задней стенки глотки и других слизистых оболочек взятые стерильным тампоном помещали в стерильную пробирку, в соответствии с действующими в настоящее время методическими указаниями. Интервал между взятием материала и его посевом не превышал 2 часов. Клинические пробы различного происхождения изучали согласно действующим нормативным документам.

Бактериологическое исследование проводилось в лаборатории «Клиническая микробиология» ООО НПП «Питательные среды» г. Махачкалы.

Идентификацию микроорганизмов проводили по общепринятым схемам с использованием типоспецифических сывороток. Из взятого материала одновременно с посевом готовили мазки с окраской по Граму и последующей их микроскопией с иммерсионным объективом. Определяли степень обсемененности материала и спектр идентифицированных микроорганизмов.

Количество микроорганизмов выражали в следующих единицах:

1) количество колониеобразующих единиц на 1 стандартном тампоне (КОЕ/т) или в 1 мл биологической жидкости (КОЕ/мл) при микробной обсемененности до 1000 клеток

2) десятичный логарифм (lg) при микробной обсемененности 1000 и более микробных клеток на 1 тампоне или в 1 мл биологической жидкости.

Этиологически значимыми считали количество микробных клеток –  $10^4$  мл для ТБА, –  $10^4$  мл и выше для мазка со слизистой зева.

Выделенные культуры микроорганизмов идентифицировали до вида на основании комплекса тинкториально-морфологических, биохимических и серологических тестов.

Для биохимической идентификации выделенных культур использовали микротестсистемы для идентификации стафилококков (МТС-S) и для энтеробактерий (МТС-M12E) производства НПО «Питательные среды» ФГУП «НПО «Микроген» (г. Махачкала) и компьютерной программы «Микротестсистемы в лабораторной диагностике».

Идентификация энтеробактерий проводилась на основании биохимической активности с использованием тест-системы «МТС-M12E». Микротестсистема представляет собой набор из 12 субстратно-индикаторных сред для ускоренного выявления биохимической активности энтеробактерий. Включает специфические тесты определения утилизации цитрата, малоната, углеводов - глюкозы, лактозы, маннита, мальтозы, наличия фенилаланиндезаминазы,  $\beta$ -галактозидазы и аргининдегидролазы, активности уреазы, обнаружения индола и сероводорода. Визуальное определение по изменению цвета субстрата при посеве исследуемых образцов.

Набор реагентов позволяет за 18-24 часа инкубирования осуществить идентификацию бактерий семейства *Enterobacteriaceae* по ферментативной активности микробиологическим методом: культуру выделяют из нативного материала на скошенном питательном агаре, смыв микробной суспензии вносят во все ячейки контейнера с дифференциально-диагностическими средами, анаэробные условия создают стерильным вазелиновым маслом. При положительном результате наблюдают изменение исходного цвета субстратов по сравнению с контролем. Тест-системы «МТС-M12E» и цветной указатель представлены на Рисунке 3 и в Таблице 3.

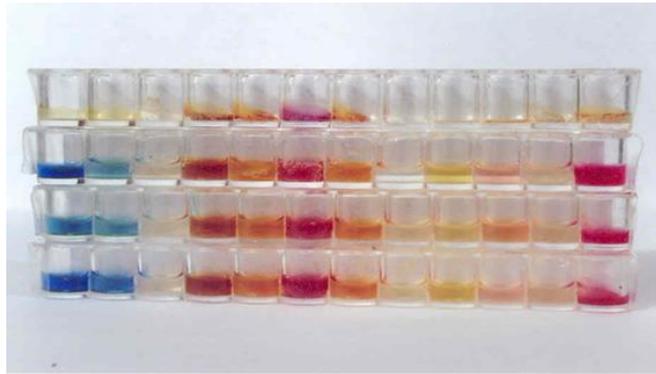


Рис.3 Биохимическая идентификация энтеробактерий с использованием тест-системы «МТС-М12Е»

Таблица 3

Цветовой указатель для «МТС-М12Е»

Тесты	Положительная	Отрицательная реакция
утилизация цитрата натрия	Сине-зеленый, голубой	желтый, зеленый
утилизация малоната натрия	-	-
наличие фенилаланиндезаминазы	темно-зеленый	бесцветный
ферментация глюкозы	желтый	красный
ферментация лактозы	-	-
ферментация маннита	-	-
ферментация мальтозы	-	-
индолобразование	фиолетовое кольцо	бесцветный, светло-коричневый
наличие $\beta$ - галактозидазы	желтый	бесцветный
наличие уреазы	Розовый, малиновый	Светло-желтый
образование $H_2S$	Черный, серый	-
наличие лизиндекарбоксилазы	Оранжево-красный	желтый

В мировой бактериологической практике наряду с классическими питательными средами (Эндо и др.) для выделения и дифференциации микроорганизмов, широкое распространение получили хромогенные питательные среды (ХПС).

Для оптимизации и усовершенствования методов микробиологической диагностики пневмоний у новорожденных и, в частности РНП и ВУП у новорожденных, для бактериологического исследования клинического материала мы также в своей работе применяли экспериментальные образцы хромогенных питательных сред для прямого выделения и идентификации возбудителей.

Хромогенные питательные среды (ХПС) для одноэтапного выделения и идентификации условнопатогенных бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (*E.coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*): среда *E.coli*-coliform-Proteus хром агар для выделения и прямой идентификации *E.coli*, колиформных бактерий и протеев, а также среда Клебсиелла хром агар - для выделения и прямой идентификации клебсиелл. Сравнительная характеристика классической схемы бактериологического исследования и схемы с использованием ХПС представлена на Рисунке 4.



Рис. 4 Классическая схема бактериологического исследования и схема с использованием ХПС

Как видно из рисунка, такой подход позволял ускорить микробиологическую диагностику пневмоний с выделением патогена, что сокращало время постановки антибиотикограммы и начало проведения этиотропной терапии.

Метод определения стафилококков (ГОСТ 10444.2 - 94)

Из навески исследуемого продукта готовили ряд десятикратных разведений. Посев разведений производили на солевой бульон. Посевы инкубировали в

течение 18-24 часов. Для подтверждения принадлежности микроорганизмов к стафилококкам делали посевы на поверхность селективно-диагностической среды (желточно-солевой агар). Посевы инкубировали при температуре 37°C в течение 24-48 часов, после чего просматривали и отмечали рост характерных колоний.

На желточно-солевом агаре колонии *S. aureus* окружены зоной лецитиназной активности. Для подтверждения принадлежности колоний к *S. aureus* отбирали не менее 5 колоний и пересевали на поверхность скошенного мясо-пептонного агара. Посевы инкубировали при температуре 37°C в течение 24 часов. У выросших микроорганизмов определяли отношение к окраске по Граму, способность коагулировать плазму крови кролика, образовывать каталазу и ферментировать маннит в анаэробных условиях.

#### Желточно-солевой агар (ЖСА)

В расплавленный и остуженный до 60°C МПА рН 7,2 с 10% раствор хлористого натрия прибавляют 10-20 процентов желточной взвеси в соотношении 3:1. Предварительно желток асептически извлекают из яйца, взбалтывают с 200 мл физиологического раствора. Затем агар тщательно смешивают с желточной взвесью и разливают в чашки Петри.

Лецитовителлазную активность оценивали при посеве культур на ЖСА. При наличии фермента вокруг выросших колоний регистрировали специфический венчик.

#### Плазмокоагулирующую активность

К плазме крови кролика, разлитой по пробиркам, добавляли по одной петле испытуемых культур, оставляя одну пробирку с разведённой плазмой в качестве контроля незасеянной. Внесённую культуру размешивали и помещали в термостат при температуре 37°C. Если через 6 ч коагуляции не происходило, то пробирки оставляли при температуре 30°C на 24 ч. Если и через 24 ч плазма не коагулировала, то испытуемую культуру стафилококка относили к коагулазоотрицательной.

Реакцию считали положительной, если:

1. В плазме образуется небольшой компактный сгусток (++);

2. Образуется большой уплотненный сгусток (+++);
3. Плазма вся скоагулировала, сгусток не меняет своего положения при перевёртывании пробирки (++++).

Для изучения ДНКазной активности суточную культуру засеивали коротким штрихом на поверхность двухпроцентного подсушенного питательного агара, который помещали в термостат на 18-24 часа, затем поверхность агара заливали 5 мл 3 моль/л раствора HCl. Через 2 минуты кислоту сливали и оценивали результаты – в случае появления вокруг культуры зоны просветления, превосходящей не менее чем в 4 раза зону роста бактерий, результат оценивали как положительный.

Каталазную активность культур оценивали следующим образом: к суточной культуре добавляли равный объем свежеприготовленной 5%-ной перекиси водорода. При наличии фермента каталазы перекись водорода разлагается с образованием пузырьков газа.

Гемолитическую активность культур исследовали на кровяном агаре с 5% эритроцитов человека или кролика. Учет проводили через 24-48 часа по наличию зон полного или неполного гемолиза вокруг выросших колоний.

#### Ферментация маннита в анаэробных условиях

Среду с маннитом разливали в пробирки по 10 мл, стерилизовали. Перед посевом среду освобождали от воздуха (пробирки кипятили в водяной бане при температуре 100°C 10 мин.), затем быстро охлаждали в ледяной воде и немедленно производили посев уколом. Сверху заливали расплавленный 2% водной агар слоем 2-3 см, чтобы исключить попадание воздуха. Посевы термостатировали при температуре 37°C в течение 4 суток. Результаты считали положительными, когда нижние и верхние части среды чётко изменяли цвет с зелёного на синий. В этом случае микроорганизмы идентифицируются как *Staphylococcus aureus*. Данные представлены в Таблице 4.

**Идентификация стафилококков (Медицинская микробиология, вирусология и иммунология, 2016)**

Признаки	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>
Морфология, окраска по Граму	Мелкие кокки Грамм (+)	Кокки Грамм (+)	Крупные кокки Грамм (+)
Реакция плазмокоагуляции	+	–	–
Ферментация маннита в анаэробных условиях	+	–	–

*Примечание* - (+) – реакция есть; (–) – реакции нет

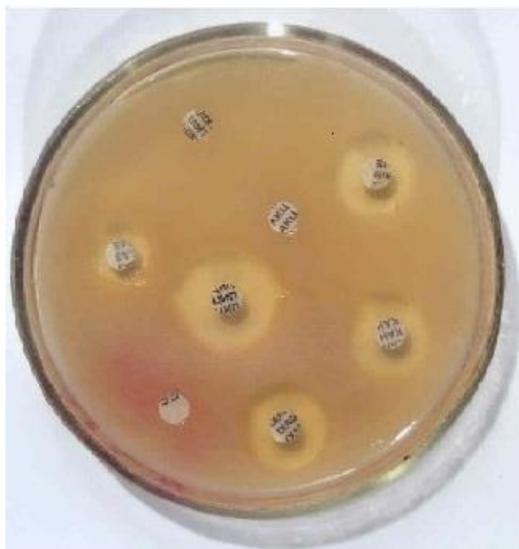
**Определение чувствительности бактерий к антибактериальным препаратам.**

**Диско-диффузионный метод**

Для определения чувствительности бактериальных культур к антибиотикам использовали коммерческие диски (НИИЦФ, Санкт-Петербург) с определенными концентрациями антибактериальных препаратов пяти функциональных классов: бета-лактамы - ампициллин (10 мг/л), тикарциллин (75 мг/л), тикарциллин /клавулановая к-та (75/10 мг/л), цефалепорон (75 мг/л), цефотаксим (10 мг/л) и цефтазидим (30 мг/л), меропенем (10 мг/л); аминогликозиды - гентамицин (10 мг/л), стрептомицин (10 мг/л), нетилмицин (10 мг/л), миноциклин (30 мг/л), амикацин (10 мг/л); тетрациклины - тетрациклин (10 мг/л), доксициклина гидрохлорид (10 мг/л); фторхинолоны - ломефлоксацин (10 мг/л), норфлоксацин (10 мг/л), офлоксацин (5 мг/л); фениколы - хлорамфеникол (10 мг/л).

Определение чувствительности к антибиотикам штаммов бактерий проводили при использовании диско-диффузионного метода. Для этого засеивали газон 100 мкл бактериальной суспензии, эквивалентной стандарту мутности 0,5 по McFarland и содержащей примерно  $1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл бактериальной культуры,

и выкладывали на поверхность агара целлюлозные диски, содержащие антибиотик. После инкубации чашек в термостате при 37°C в течение 18-24ч. учитывали результат путем измерения диаметра зоны задержки роста бактериальной культуры вокруг диска в мм. Антибиотикограмма представлена на Рисунке 5.



**Рис.5 Определение чувствительности к антибиотикам диско-диффузионным методом**

### **Санитарно-бактериологическое исследование объектов внешней среды и медперсонала родильного дома**

Санитарно-микробиологическое исследование предметов обихода и окружающей обстановки проводили для осуществления контроля за общим гигиеническим состоянием и определения фекальной загрязненности и контаминации патогенными микроорганизмами объектов окружающей среды как возможных факторов при передаче возбудителей инфекционных болезней.

Для оценки санитарного состояния отделений родильного дома определяли загрязненность медицинского оборудования и рук персонала.

Бактериологическое исследование смывов с ВДП и рук медперсонала

Из ВДП материал забирали натошак или через 2 часа после еды стерильным тампоном со слизистой оболочки или ее пораженных участков. Смыв с поверхности рук проводили увлажненным стерильным ватным тампонами. Смывы делали с обеих рук, тщательно протирая ладони, межпальцевые и подногтевые пространства. Затем тампон помещали в пробирку со стерильной водой или физраствором, в котором его тщательно прополаскивали.

Из исходного смыва делали посевы на чашки Петри с МПА (на общее бактериальное загрязнение) и на среду Эндо (на наличие БГКП). Посевы выдерживали в термостате при температуре 37°C в течение суток. Из колоний, характерных для БГКП, готовили мазки, окрашивали их по Граму, микроскопировали, при необходимости дополнительно идентифицировали по общепринятым тестам для БГКП.

Бактериологическое исследование смывов с поверхности предметов

Взятие смыва осуществляли при помощи стерильного ватного тампона или стерильной марлевой салфетки. Непосредственно перед взятием смывов тампоны (или салфетки) смачивали в пробирке со стерильной водопроводной водой (2 мл). После тщательного протирания исследуемого объекта смоченным тампоном (или салфеткой) его помещали в ту же пробирку. Смывы с поверхности рабочих панелей аппаратуры и оборудования ОРИТ делали с помощью трафаретов (шаблонов) из проволоки, имеющих площадь 25 см<sup>2</sup> (100 см<sup>2</sup>). Трафареты перед взятием смывов стерилизовали над пламенем горелки, затем накладывают на исследуемую поверхность и с площади, ограниченной шаблоном, производят смыв тампоном (или салфеткой).

В пробирку после взятия смыва добавляли 8 мл стерильной воды, в которой тщательно прополаскивают тампон. Из исходного смыва делали посевы на МПА и среду Эндо.

Смывы исследовали на общее бактериальное загрязнение (микробное число) и на наличие БГКП.

Исследование микрофлоры воздушной среды проводили с использованием аппарата Кротова. Метод Кротова является более точным количественным методом определения микробного числа воздуха с помощью специального прибора. Для подсчета КОЕ микроорганизмов в работе использовали чашки Петри с сухим питательным агаром (СПА). На аппарате устанавливали отметку в 2,5 л/мин и пропускали 100 литров воздуха в течение 4 минут. Для определения стафилококковой обсемененности использовали чашки Петри с желточно-солевым агаром (ЖСА), для этого, на отметке в 2,5 л/мин в течение 10 минут пропускали соответственно 250 литров воздуха.

Расчет микробного числа производили по формуле (1):

$$X = A \times 1000 / V \quad (1)$$

X - количество санитарно-показательных микроорганизмов в м<sup>3</sup> воздуха;

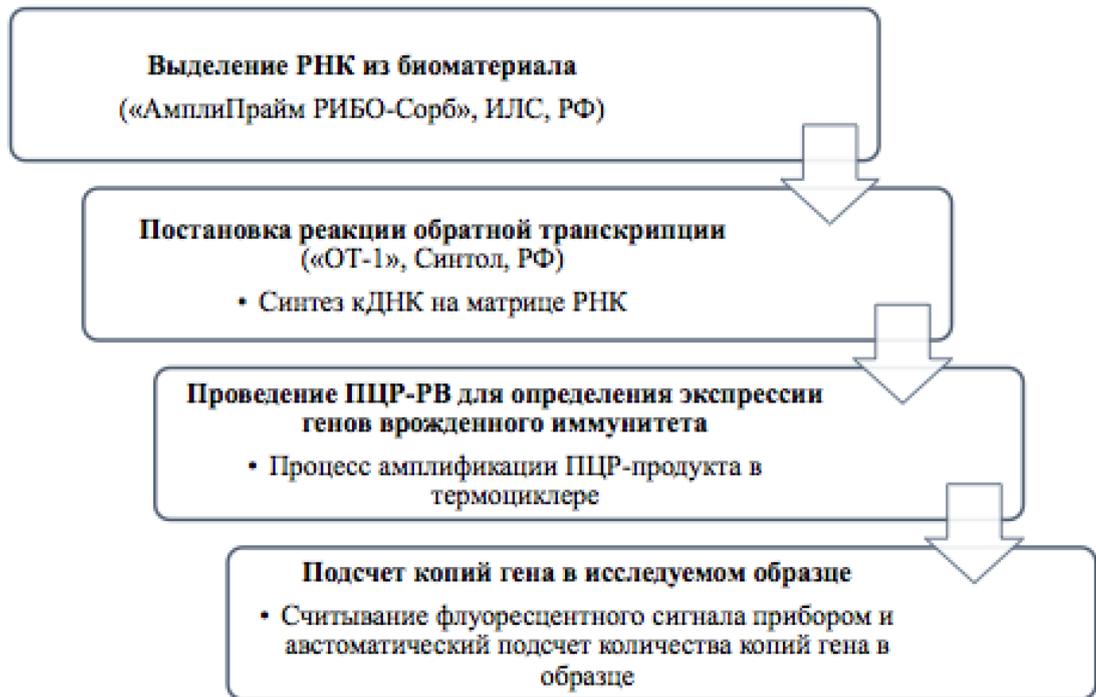
A – количество микробных колоний, выросших на чашке Петри;

V – объем пропущенного через прибор воздуха в литрах;

1000 – искомый объем воздуха

#### **2.2.4. Методы, используемые для диагностики показателей иммунитета**

Иммунологическое исследование биоматериала от новорожденных проводили в лаборатории молекулярной иммунологии ФГБУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова» РАМН (заведующая лабораторией, чл.-корр. РАН, д.м.н. О.А.Свитич) с использованием стандартных тестов. Схема иммунологического исследования представлена на Рисунке 6.



**Рис. 6 Схема иммунологического исследования**

Проспективное исследование проводилось в строгом соответствии с этическими нормами «Хельсинской декларации» (WMA, 1964) и «Декларации о политике в области обеспечения прав пациента в Европе» (WHO/EURO, 1994).

#### **2.2.4.1. Выделение нуклеиновых кислот (ДНК и РНК)**

Получение биологического материала для последующих исследований осуществлялось путем соскоба эпителиальных клеток слизистой оболочки верхних дыхательных путей новорожденных и родильниц, в также крови.

Для определения уровня экспрессии генов в группе здоровых доноров забор эпителиальных клеток слизистой оболочки верхних дыхательных путей новорожденных (из зева). Образцы клеток собирались с помощью цитощетки и переносились в 1,5 мл пробирки типа «Эппендорф» с содержащимся в них лизирующим раствором (ИЛС, РФ). Образцы хранили при температуре минус 70<sup>0</sup>С. Материал эпителиальных клеток в последующем использовался для

определения генетических маркеров, а также для оценки уровня экспрессии исследуемых показателей врожденного иммунитета.

Из клинического материала выделяли ДНК и РНК методом аффинной сорбции на частицах силикагеля, используя набор «АмплиПРАЙМ Рибо-сорб» (ИнтерЛабСервис, РФ) строго в соответствии с протоколом.

Протокол выделения: лизирующий раствор прогреть до полного растворения кристаллов при 65°C на термостате «Термит» («ДНК-технология», РФ) и внести в промаркированные пробирки по 450 мкл лизирующего буфера и 100 мкл образца. Содержимое пробирки перемешать на мини-центрифуге Микроспин FV-2400 (Латвия), процетрифугировать 5 сек при 5000 об/мин на микроцентрифуге HighSpeedMiniCentrifuge (Германия). По 25 мкл ресуспензированного сорбента добавить в каждую пробирку, перемешать и осадить на микроцентрифуге в течение 30 сек при 10 тыс.об/мин. После этого надосадочную жидкость удалить. В пробирки добавить по 400 мкл раствора для отмывки 1, перемешать до полного растворения сорбента, процетрифугировать при 10 тыс. об/мин 30 сек. и удалить надосадочную жидкость. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора для отмывки 3, перемешать до полного ресуспензирования сорбента, процетрифугировать при 10 тыс.об/мин 30 сек и удалить надосадочную жидкость. Данную отмывку производить дважды. По 400 мкл раствора 4 добавить в пробирки, перемешать до полного растворения сорбента, процетрифугировать при 10 тыс.об/мин 30 сек и удалить надосадочную жидкость. Далее осадившийся в пробирках сорбент подсушить в термостате при 60°C 15 минут, крышки пробирок должны быть открыты. Добавить в пробирки по 50 мкл элюирующего-буфера, перемешать и поместить в термостат на 2-3 мин при 60°C. Перемешать и процетрифугировать пробирки на максимальных оборотах в течение 1 мин.

Полученная надосадочная жидкость содержит очищенные как ДНК, так и РНК клеток. Полученный материал хранится при температуре минус 70°C.

Концентрацию полученных нуклеиновых кислот и их чистоту оценивали с помощью микроспектрофотометра NanoDrop 2000, позволяющий проводить быструю проверку концентраций и качества образцов нуклеиновых кислот.

Далее на полученных образцах РНК проводилась реакция обратной транскрипции (ОТ) для получения кДНК с использованием фермента ревертазы, а следующим этапом проводится ПЦР амплификация для определения уровня экспрессии исследуемых генов.

Для генетических исследований использовали ДНК, на которой непосредственно ставили реакцию ПЦР-РВ.

#### **2.2.4.2. Реакция обратной транскрипции**

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием «Набора для проведения реакции обратной транскрипции» (Синтол, РФ) для синтеза первой цепи ДНК на матрице РНК интересующего гена для последующего определения числа копий с помощью ПЦР в реальном времени.

Общий объем реакционной смеси на одну пробирку составил 25 мкл. В качестве отрицательного контроля в пробирку добавляли деионизированную воду (ddH<sub>2</sub>O), входящую в состав набора.

Постановка реакции ОТ проводится в два последовательных этапа с приготовлением смеси №1 и смеси №2. В отдельном эппендорфе (0,6 мл) готовили смесь №1: 1 мкл Random-праймера [15 ОЕ/мл] (шестичленные олигонуклеотиды со случайной последовательностью), 1 мкл праймера Oligo(dT) [15 ОЕ/мл] и 3 мкл ddH<sub>2</sub>O. Приготовленную смесь №1 раскапывали по пробиркам по 5 мкл на одну пробу. Добавляли 5 мкл РНК, а в пробирку с отрицательным контролем вносили 5 мкл ddH<sub>2</sub>O, перемешивали с помощью вортекса (Микроспин FV-2400, BioSan) и помещали в термостат «Термит» («ДНК-технология», РФ), Инкубировали 3 мин при температуре 75°C для проведения отжига праймеров. В отдельном эппендорфе готовили смесь №2 (MMLV-RT (50 ед/мкл) 1 мкл, 2,5X Реакционная смесь 10 мкл, ddH<sub>2</sub>O 4 мкл). Пробирки после инкубации охлаждали

до 4°C и при 4°C в них вносили по 15 мкл смеси №2, инкубировали в термостате следующем температурно-временном режиме: 37°C 40 мин, 95°C 10 мин. Полученную после проведения реакции ОТ кДНК хранили при температуре минус 70°C для дальнейшего проведения ПЦР-РВ.

#### **2.2.4.3. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени**

Для определения экспрессии исследуемых генов использовали метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Реакцию проводили с применением «Набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I» и праймеров, синтезированных на фирме «Синтол», РФ. Системы для определения экспрессии исследуемых генов, были отработаны ранее на кафедре иммунологии МБФ [24].

Реакционную смесь готовили из реактивов «Набора для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I», (Синтол, РФ) и разносили в пробирки по 12 мкл, и добавляли по 3 мкл проб кДНК, полученных с помощью реакции ОТ. В качестве контроля использовали две пробы: реакционная смесь + dd H<sub>2</sub>O (К-) и реакционная смесь + отрицательный контроль реакции ОТ (ОТК-).

Реакцию ПЦР-РВ проводили на ПЦР-амплификаторе (ДТ-96, «НПО ДНК-Технология», РФ) в температурно-временном режиме 95,0°C - 4 мин, (94,0°C – 20 сек, T<sub>m</sub> – 40 сек) 40 циклов.

После проведения ПЦР-РВ получали зависимости интенсивности флуоресценции от количества циклов амплификации.

Определение количества копий исследуемых генов производился по калибровочным прямым, ранее разработанным на кафедре иммунологии МБФ [24]. Стандартизация результатов ПЦР-РВ, полученных в процессе исследования, проводили относительно уровня экспрессии гена *β-актина*.

Для каждого образца получали значение логарифма числа копий исследуемого гена и числа копий гена *β-актина* для нормировки результатов.

Количество копий определяемого гена в дальнейшем пересчитывалось относительно 1 млн. копий гена  $\beta$ -актина.

ПЦР-РВ для оценки полиморфных маркеров (-308G/A) в гене TNFA и (-1082 A/G) в гене IL-10.

Реакционная смесь состояла из компонентов «Набора для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I» (Синтол, Россия): 1xBuffer+SYBR (1,5 мкл), 2.5 мМ dNTP (1,5 мкл), 25 мМ MgCl<sub>2</sub> (1,5 мкл), 5 ед/мкл Таq-ДНК-полимераза (0,3 мкл), Праймер прямой\* 1 ОЕ/мл (1 мкл), Праймер обратный\* 1 ОЕ/мл (1 мкл). Общей объем смеси составлял 12 мкл, образца – 3 мкл (50-500 нг).

\* для определения полиморфизма (-308G/A) в гене *TNF- $\alpha$*  и (-1082 A/G) в гене *IL-10* готовили два микса.

В первом в качестве прямого праймера использовали праймер для определения аллеля *A*, во втором - для определения аллеля *G*, в качестве обратного – общий для обеих смесей праймер.

Реакция проводилась на амплификаторе ДТ-96 («ДНК-технология», Россия) по следующей программе: 94°C – 2 мин; (94°C – 30 сек, 61°C – 1 мин, 72°C – 1 мин) 40 циклов; плавление (100 циклов - 90°C – 15 сек.).

В результате реакции получали кривые зависимости уровня флуоресценции от циклов амплификации. Рост кривой ассоциировался с накоплением ПЦР-продукта в пробирке. Высокий уровень флуоресценции в одной из двух пробирок говорил о наличие только одного аллеля – гомозиготное состояние данного маркера. Гетерозиготное состояние маркера наблюдалось в случае высокого уровня флуоресценции в двух пробирках.

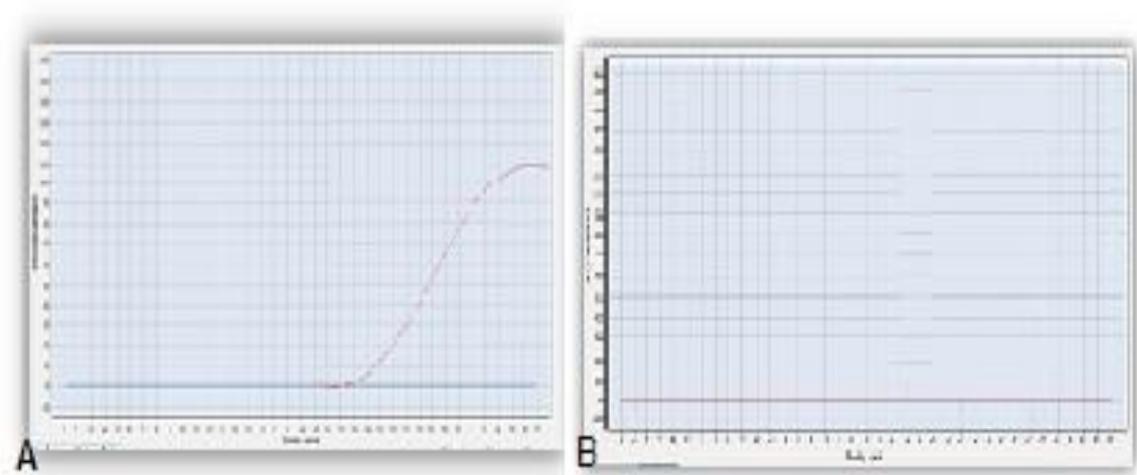
Полиморфизмы в генах *IL-10* (s01187-100, C-592A), *IL-17* (s01171-100, G-197A), *TLR2* (01173-100, Arg753Gln), *TLR4* (01285-100, Asp299Gly) выявляли с использованием соответствующего набора (НПФ «Литех», РФ) согласно протоколу производителя. Метод основан на амплификации каждой аллели отдельно, поэтому по окончанию реакции можно качественно оценить, какие из

аллелей присутствуют в образце и, тем самым, определить гомозиготный или гетерозиготный вариант по данному SNP в исследуемой пробе.

Протокол реакции (на примере TLR4):

1. Подготовить две пробирки типа Эппендорф, для приготовления смеси для Аллелей 1 и 2 соответственно.
2. Внести в пробирки по 17,5µl разбавителя, 2,5µl реакционной смеси для соответствующей аллели, 1µl ПЦР-буфера с SYBR Green I, 0,4µl термостабильной ДНК-полимеразы в расчете на 1 пробу.
3. Раскапать ПЦР-микс по 21µl в пробирки для ПЦР и внести каждую образец в объеме 4µl.

Результат проведенной реакции на примере одной пробы показан на Рисунке 7.



**Рис. 7 Кинетические кривые ПЦР при определении полиморфизма *Asp299Gly* в гене *TLR4* в одном из исследуемых образцов**

А. Реакция с праймерами для Аллели 1. Рост кривой говорит об успешной амплификации Аллели №1 (Asp).

В. Реакция с праймерами для Аллели 2. Видно, что Аллель № 2 отсутствует в данном образце, следовательно, генотип пациента по данному полиморфизму – *Asp/Asp*.

### 2.2.5. Биоинформационный анализ

В работе мы использовали программу Pathway Studio® и реферативную базу данных ResNet® компании Ariadne Genomics (США). Объектами базы данных ResNet являются аннотации биологических объектов (в частности, белков, клеточных процессов и болезней), а также аннотации функциональных связей между ними, сформированные в результате обработки текстового массива полнотекстовых статей и абстрактов, индексированных в Medline (совместно со с.н.с. ЛМИ В.В. Соболевым)

### 2.2.6. Статистические методы обработки данных

Статистический анализ проводили с использованием общепринятых статистических методов, рассчитывая в группах данных:

-среднее арифметическое ( $\bar{X}$ ),  $\bar{X} = \sum x_i / n$ ,

-дисперсию ( $\sigma^2$ ),  $\sigma^2 = \sum (x_i - \bar{X})^2 / n$ ,

-среднее квадратичное отклонение ( $\sigma_x$ ),  $\sigma_x = \sqrt{\sum (x_i - \bar{X})^2 / n}$ , где  $x_i$ —значение варианта,  $n$ —число экспериментов.

Применяли также компьютерную статистическую программу BioStat, а также программу Excel. В таблицах и рисунках результаты представлены в виде  $\bar{X} \pm \sigma$ . Для сравнения групп данных использовали параметрический критерий Стьюдента ( $t$ ), а также непараметрические методы статистической обработки данных. В связи с разным числом наблюдений в каждой из групп для оценки статистической достоверности различий экспрессии генов в исследуемых группах использовали непараметрический критерий Манна-Уитни [61].

Для статистической обработки результатов по качественным признакам (полиморфным маркерами - сравнение частот аллелей и генотипов) использовали несколько непараметрических критериев: критерий  $\chi^2$  и точный критерий Фишера. Основой статистической обработки данных по полиморфным маркерам

был  $\chi^2$  – анализ четырехпольных таблиц распределения аллелей, генотипов и гаплотипов в норме и в контроле. Достоверными считались различия при  $p < 0,05$ . Если в исследуемой группе количество значений было невелико, то меняли точный критерий Фишера. Нулевая гипотеза состоит в том, что между двумя группами нет никакой связи, альтернативная гипотеза – что есть. Оценка статистической значимости полученных отличий проводилась по формулам, приводимым в медико-биологической статистике [61].

Помимо достоверности различия частот, вычисляли отношение шансов (OR), которое характеризует риск заболевания. Отношение шансов рассчитывается по следующей формуле (2):

$$OR = A \times D / B \times C \quad (2)$$

A - число лиц с наличием признака среди опытной группы

B - число лиц с отсутствием признака в опытной группе

C - число лиц с наличием признака среди контрольной группы

D - число лиц с отсутствием признака в контрольной группе.

Если  $OR > 1$ , то, следовательно, существует положительная ассоциация признака с аллелем (генотипом),  $OR < 1$  – отрицательная ассоциация. Если  $OR = 1$ , следовательно, риск отсутствует. OR вычисляется с 95% доверительным интервалом (CI), который представляет собой интервал, в пределах которого с вероятностью 95% находится ожидаемое значение OR.

### ГЛАВА 3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ. КЛИНИКО-РЕНТГЕНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НЕОНАТАЛЬНЫХ ПНЕВМОНИ

Говоря о клинике и диагностике неонатальной пневмонии, следует подчеркнуть, что ранние клинические симптомы могут быть неспецифичны [34]. Часто дети рождаются в критическом состоянии, требующем проведения реанимационных мероприятий. Очень важно оценить анамнез и выделить в нем инфекционные факторы [129; 130]. Так как нарушения в становлении дыхательной функции при рождении могут быть постасфиктического и постаспирационного характера, но генез этих патологических синдромов может быть обусловлен инфекционной патологией [79].

В обследованном отделении реанимации и интенсивной терапии родильного дома Республиканской клинической больницы г. Махачкалы было обследовано 230 новорожденных с диагнозом внутриутробная пневмония и 246 с диагнозом ранняя неонатальная пневмония. Группу сравнения составили здоровые новорожденные (103). Диагноз подтверждался на основании клинико-лабораторных данных первых 72 часов после рождения.

По клиническим характеристикам все новорожденные дети находились в тяжелом состоянии, с нарушениями дыхательной деятельности (раздувание крыльев носа, ретракция грудной клетки, тахипноэ.). У новорожденных отмечался цианоз, угнетение или возбудимость ЦНС, нарушения температурного контроля и др.

У всех наблюдавшихся новорожденных из группы контроля, состояние при рождении оценивалось как удовлетворительное, отмечалось физиологическое течение раннего периода адаптации. Соматических расстройств у данной группы новорожденных не отмечалось, и они были выписаны домой в удовлетворительном состоянии на 3-4-е сутки жизни.

Для решения задачи по прогнозированию риска развития пневмоний у новорожденных требуется определение информативных критериев. В этой связи нами проведена оценка анамнестических данных родильниц новорожденных с

внутриутробными и ранними неонатальными пневмониями с группой сравнения.

Статистически значимых различий социально-демографических факторов таких как: семейное положение, образовательный уровень, род занятий и наличие профессиональной вредности у родильниц, родивших здоровых доношенных новорожденных и новорожденных с пневмонией, обнаружено не было.

### **3.1. Предикторы риска развития неонатальных пневмоний**

В начале исследования нами были изучены факторы риска развития пневмоний у новорожденных. Во всех клинических группах по результатам информативности определена сравнительная диагностическая ценность факторов риска.

Мы учитывали факторы, указывающие на возможную реализацию инфекционного процесса у ребенка. И первый такой фактор - состояние здоровья родильниц (анемия во время беременности, наличие хронических очагов инфекции, обострение во время беременности вирусных и бактериальных инфекций и т.д.).

Показательно, родильниц с осложненным акушерско-гинекологическим анамнезом значительно чаще наблюдали в группе новорожденных с РНП, чем в группах детей с ВУП и здоровых новорожденных. У родильниц контрольной группы заболеваемость представлена лишь анемией - 11,2% ( $p < 0,01$ ). Остальные заболевания наблюдались только в основных группах родильниц. Данные отображены на Рисунке 8.

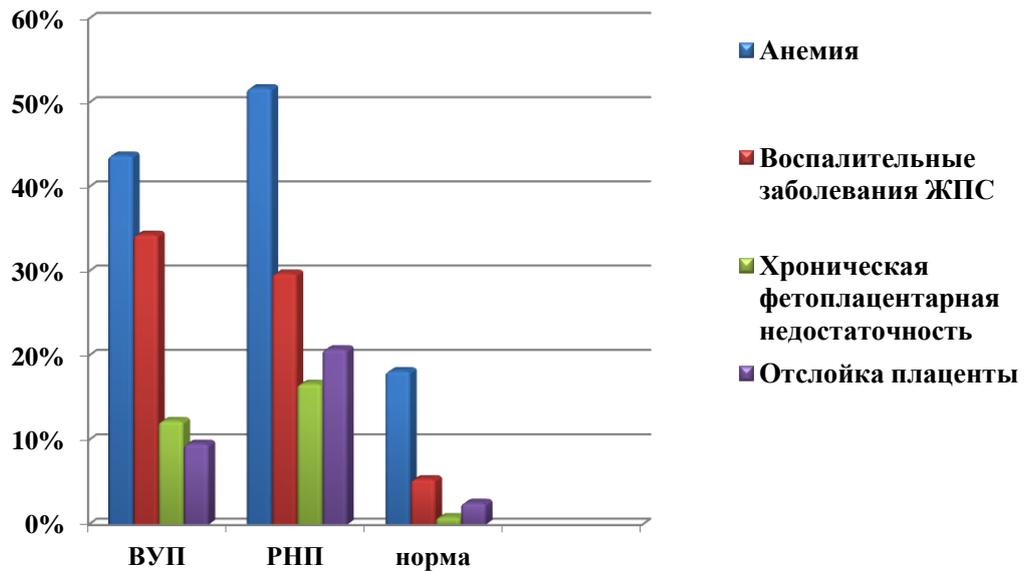


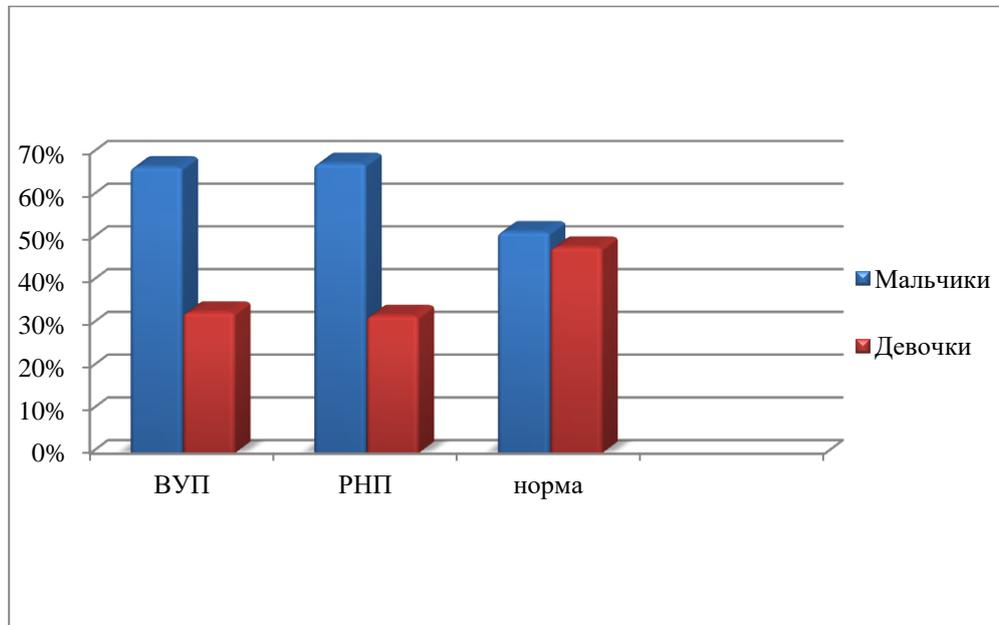
Рис. 8 Анте - и интранатальные факторы риска развития ВУП и РНП у новорожденных ОРИТН родильного дома ГБУ РД «РКБ»

В группе РНП достоверно чаще выявлялось экстрагенитальная патология, чем в группе с ВУП ( $p < 0,01$ ). Экстрагенитальная заболеваемость представлена в равных количествах анемией ВУП – 43,8% и РНП – 57,8%, ( $p > 0,05$ ). Хроническую фетоплацентарную недостаточность при ВУП - 12,3%, при РНП - 16,7% и отслойку плаценты (9,6% и 20,8% соответственно) наблюдали в основных группах, а в контрольной группе встречали в единичных случаях. Достоверно чаще в группе родильниц новорожденных с внутриутробными пневмониями отмечались воспалительные заболевания женской половой сферы (ЖПС) – 34,4% ( $p < 0,01$ ), а отслойку плаценты наблюдали чаще у родильниц в группе новорожденных с ранними неонатальными пневмониями - 20,8% ( $p < 0,01$ ).

Анализ анамнестических характеристик родильниц новорожденных с диагнозом ВУП и РНП позволил установить, что факторами риска развития пневмонии у новорожденных являются следующие ОАГА, отмечавшиеся у родильниц, это: анемия, наличие воспалительных заболеваний женской половой сферы, хроническая фетоплацентарная недостаточность и отслойка плаценты.

При оценке распределения новорожденных по половой принадлежности

обнаружилось статистически значимое преобладание мальчиков в группах новорожденных с ВУП и РНП: 67% и 67,8 % соответственно против 51,8 %. В контрольной группе новорожденных достоверных различий по полу не выявлено. Результаты оценки представлены на рисунке 9.



**Рис. 9 Половая принадлежность новорожденных с диагнозом ВУП и РНП**

Считается достоверным факт, что у новорожденных мужского пола снижена резистентность к инфекционным агентам, и они заболевают чаще и имеют неблагоприятный исход пневмонии, чем девочки. Так как синтез иммуноглобулинов связан с X-хромосомой, у девочек в случае мутации в одной из X-хромосом возможна компенсация за счет другой, вследствие чего содержание Ig G и Ig A у мальчиков ниже, чем у девочек. Данные полученные в исследовании коррелируют с литературными данными [73; 110].

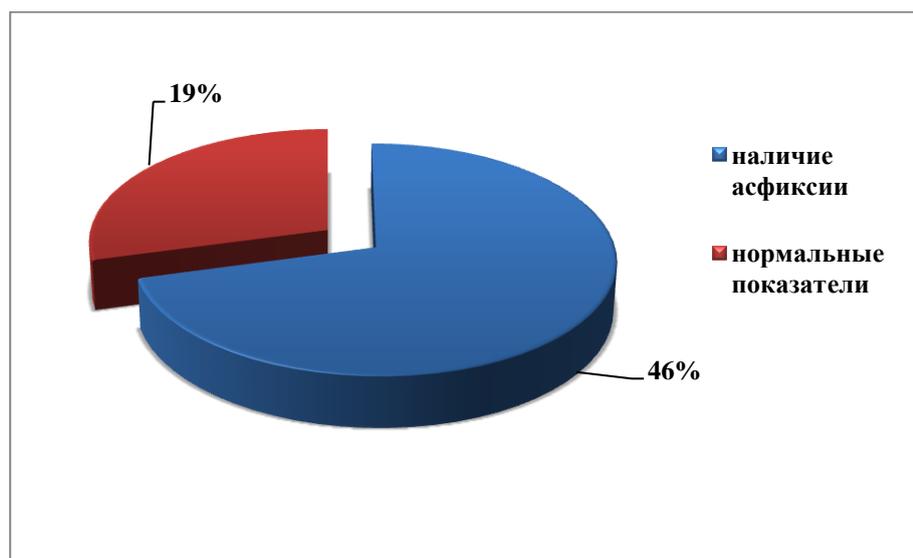
Таким образом, мужской пол новорожденных является фактором риска возникновения пневмонии у новорожденных.

Оценка клинических признаков, отражающих состояние новорожденного при рождении, выявил влияние асфиксии (оцененной по шкале Апгар) и задержки

внутриутробного развития плода (ЗВУР) на формирование дыхательных расстройств у новорожденных в группах наблюдения.

Для группы здоровых новорожденных оценка по шкале Апгар на первой минуте жизни составила 7-8 баллов. Для группы новорожденных с ВУП - 3 балла, а с РНП – 4 балла.

В тоже время, в группе здоровых новорожденных не было детей с тяжелой асфиксией (оценка по шкале Апгар 1-3 балла), в то время как в группе новорожденных с ВУП и РНП они составляли практически половину - 46%; соотношение нормальных показателей и среднетяжелой асфиксии (оценка по шкале Апгар 4–7 и от 8 до 10 баллов соответственно) в группах здоровых новорожденных и детей с ВУП и РНП 19 % против 46 % ( $p < 0,01$ ), различия статистически значимы. Данные отражены на Рисунке 10.



**Рис.10 Соотношение среднетяжелой асфиксии и нормальных показателей у новорожденных с ВУП и РНП**

Следовательно, асфиксия и результат оценки по шкале Апгар от 1 до 7 баллов на первой минуте жизни являются фактором риска развития пневмонии у новорожденных.

Еще один фактор риска – влияние длительности безводного периода более 24 часов. В литературных источниках есть описание этого фактора, как фактор

риска развития пневмонии. Данные полученные нами коррелируют с литературными данными. Проведение респираторной поддержки с рождения, сопряженной с асфиксией у новорожденных, приводят к вторичному дефициту сурфактанта и повреждению легких. Следовательно, вполне логично эти данные могут служить предикторами развития неонатальных пневмоний.

Таким образом, прогноз развития пневмонии у новорожденного зависит не от одного конкретного фактора риска, а опосредуется суммарным влиянием таких составляющих, как: отягащенный акушерско-гинекологический анамнез родильницы, продолжительность безводного периода более 24 часов, асфиксия при рождении новорожденного, эффективность реанимационных мероприятий в течение первых пяти минут жизни, наличие респираторной терапии с рождения [110].

### **3.2. Дифференциальная диагностика внутриутробных и ранних неонатальных пневмоний**

Довольно затруднительно провести дифференциальный диагноз между внутриутробной и ранней неонатальной пневмониями, поскольку клинически специфических отличий не наблюдали [31; 93].

Клинические проявления врожденной пневмонии появлялись сразу после рождения или спустя несколько часов. Особенности этих проявлений мы наблюдали у 230 новорожденных. Из-за тяжести состояния все новорожденные находились в ОРИТН родильного дома.

Как известно, еще до рождения воспаление легких незначительно компенсируется за счет того, что существует питание ребенка через плаценту. После рождения младенца функционально дебютируют два круга кровообращения, и после первого вдоха легкие новорожденного расправляются. И тогда спустя несколько часов после рождения нарастает гипоксия тканей, и появляются симптомы врожденной пневмонии.

При изучении особенностей клиники внутриутробных пневмоний на современном этапе установлено, что она полиморфна. У большинства

новорожденных с первых часов жизни отмечались признаки дыхательной и сердечно-сосудистой недостаточности. При осмотре отмечалась чаще вялая реакция в 72,5%, чем беспокойство 27,5% ( $p < 0,05$ ). Статистически достоверно у 7,9% новорожденных наблюдали повышение температуры (выше  $38^{\circ}\text{C}$ ), у 92,1% ( $p < 0,01$ ) - температурной реакции не было. Чаще наблюдалось ослабление врожденных рефлексов - 63,6%, реже - угнетение 36,4% ( $p < 0,05$ ).

Физиологические рефлексы ослаблены - 69,7% или угнетены - 30% ( $p < 0,01$ ). У большинства новорожденных отсутствовал акт сосания - 72,8%, у 27,2% новорожденных ( $p < 0,01$ ) отмечали отсутствие акта глотания.

У обследованных новорожденных кожные покровы были бледно-серые (52,6%) и бледные, с цианотичным оттенком - 47,4% ( $p < 0,01$ ), на фоне интоксикации у новорожденных отмечалась петехиальная сыпь. У большинства новорожденных, как показано на Рисунке 11 отмечался акроцианоз (поражены дистальные участки: кончик носа, языка, кистей, стоп, губы, мочки ушей) - 92,6% ( $p < 0,05$ ).



**Рис.11 Акроцианоз у новорожденного с ВУП**

Респираторная симптоматика у новорожденных характеризовалась всеми специфическими проявлениями пневмонии: одышка 96,5% ( $p < 0,001$ ) с участием

вспомогательной мускулатуры, в связи с чем новорожденные 76,8% ( $p < 0,001$ ) были подключены к ИВЛ. У младенцев отмечался слабый крик и на фоне гипоксии центральной нервной системы угнетенные врожденные рефлексы. Так как организм стремится восстановить необходимое количество кислорода в легких за счет активации дыхания, у новорожденных наблюдали респираторные нарушения, проявляющиеся одышкой. Одышка характеризовалась изменением частоты, глубины и ритма дыхания, раздуванием крыльев носа (72,4%). На фоне нарушения дыхания определялось тахипноэ 89,5% ( $p < 0,001$ ) и учащенное сердцебиение. Особенности клинических проявлений ВУП представлены в Таблице 5.

Таблица 5

**Клинические проявления внутриутробных пневмоний (n=230)**

Показатели	Частота встречаемости
Реакция на осмотр: - беспокойный - вялый	27,5 % 72,5 %
Температура: - нормальная - гипертермия - гипотермия	92,1% 7,9 % -
Врожденные рефлексы: - ослаблены - угнетены	63,6% 36,4%
Кожные покровы: - бледно-розовые - бледные с цианотичным оттенком	52,6% 47,4%
- акроцианоз - центральный цианоз	92,6% -
Одышка	96,5%
ИВЛ	76,8%
ЧД: - тахипноэ - брадипноэ	89,5% 10,5%

Все симптомы нарастали очень быстро и на фоне повышения температуры тела часто возникали судороги. Отмечалась гипоксическая энцефалопатия в

83,71% ( $p > 0,05$ ).

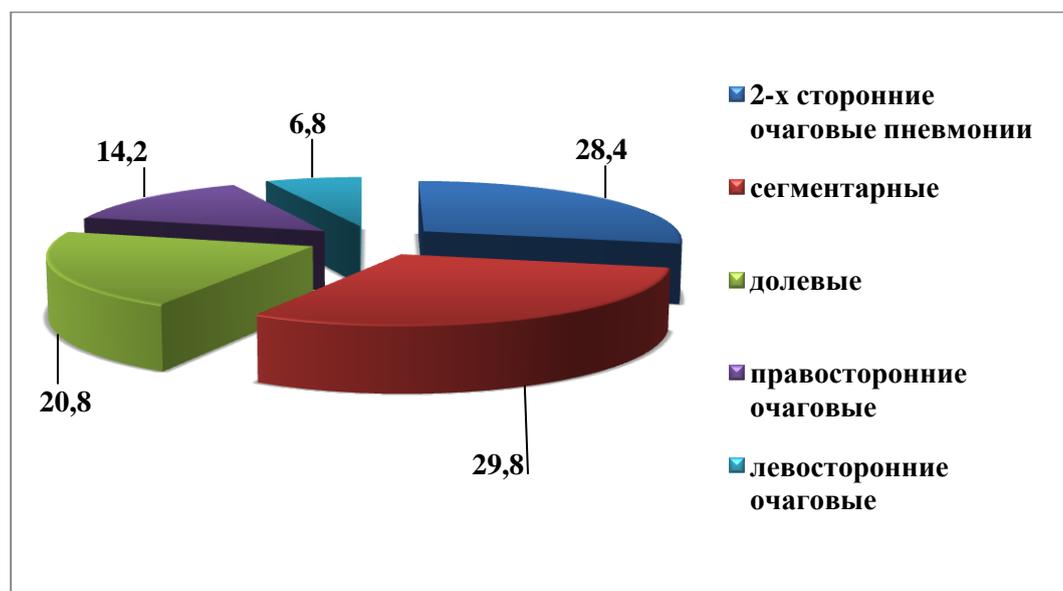
Внутриутробные пневмонии протекали на фоне сопутствующих заболеваний и состояний. Чаще всего это были ВУИ (31,4%), недоношенность (32%), реже – анемия (9,8%), переношенность (14,2%) и ЗВУР (12,6%). Однако при распределении наиболее частых сопутствующих заболеваний по тяжести пневмоний достоверных различий не выявлено.

Рентгенологическое исследование проведено у 82 новорожденных с диагнозом ВУП. Чаще выявлялись двусторонние очаговые пневмонии (28,4%), сегментарные (29,8%), долевыми (20,8%) и правосторонние очаговые (14,2%). Реже – левосторонние очаговые пневмонии (6,8%). Результат проведенного рентгенологического исследования на примере снимка одного новорожденного с диагнозом ВУП показан на Рисунке 12.



**Рис.12 Рентгеновский снимок легких новорожденного с ВУП**

Двухсторонние мелкоочаговые воспалительные инфильтраты достоверно чаще ( $p < 0,05$ ) выявлялись при пневмонии средней тяжести, а при тяжелых пневмониях – сегментарные ( $p < 0,05$ ). Реализация клинического течения ВУП на основании рентгенологических данных представлена на Рисунке 13.



**Рис.13 Рентгенологические данные внутриутробных пневмоний**

Таким образом, обширные воспалительные изменения легочной ткани у новорожденных наблюдались при тяжелых пневмониях.

Аналогичные исследования были проведены при обследовании 246 новорожденных с диагнозом пневмония в раннем неонатальном периоде. Относительно легче протекает пневмония в этот период. Поражаются легкие, но уже на фоне относительной компенсации организма ребенка к внешней среде. При изучении особенностей клинических проявлений ранних неонатальных, как и внутриутробных пневмоний установлено, что они полиморфны.

За период, когда симптомов не было, новорожденный успевает немного покормиться грудью, что дает не только силы, но и обогащает организм факторами иммунной защиты от инфекций. Поэтому симптомы неонатальной пневмонии проявляются не так выражено, но они схожи с ВУП.

Установлено, что у новорожденных из группы с РНП реакция при осмотре чаще проявлялась беспокойством 66,8%, чем вялостью 33,2% ( $p < 0,05$ ). Гипертермия наблюдалась у 42,3% новорожденных. В 68,3% наблюдали ослабление физиологических рефлексов, в 31,7% - угнетение ( $p < 0,01$ ).

На фоне этого появляется одышка с участием дополнительных мышц в этом. При этом интоксикация прогрессирует более медленно, но она также выражена и зависит от скорости распространения и тяжести инфекции.

Кожные покровы у обследованных новорожденных были бледными (23,2%). У большинства детей отмечался акроцианоз 76,5%, реже – центральный цианоз 23,5% ( $p < 0,001$ ), представленный на Рисунке 14.



**Рис.14 Центральный цианоз у новорожденного с РНП**

Со стороны органов дыхания превалировало тахипноэ, чем брадипноэ 68,5% и 31,5% соответственно ( $p < 0,001$ ). У новорожденных отмечалось ослабленное дыхание 78,5% ( $p < 0,001$ ). Особенности клинических проявлений РНП представлены в Таблице 6.

**Клинические симптомы ранних неонатальных пневмоний (n= 246)**

Показатели	Частота встречаемости
Реакция на осмотр: - беспокойный - вялый	<b>66,8 %</b> 33,2 %
Температура: - нормальная - гипертермия	<b>57,7 %</b> 42,3 %
Врожденные рефлексy: - ослаблены - угнетены	<b>68,3 %</b> 31,7 %
Кожные покровы: - бледно-розовые - бледные с цианотичным оттенком	<b>76,8 %</b> 23,2 %
- акроцианоз - центральный цианоз	<b>76,5 %</b> 23,5 %
Одышка	<b>78,5%</b>
ИВЛ	<b>76,8%</b>
ЧД: - тахипноэ - брадипноэ	<b>68,9%</b> 31,1%

Защитная реакция на воспалительный процесс в виде гипертермии была отмечена у 42,3% новорожденных.

Физиологические рефлексy были ослаблены 68,3% ( $p < 0,001$ ). У большинства детей отсутствовал сосательный рефлекс 70,5% ( $p < 0,001$ ). С ростом тяжести нарастало число детей с центральным цианозом 23,5% ( $p < 0,01$ ).

Из сопутствующих заболеваний чаще отмечалась ВУИ, недоношенность и анемия.

Результат проведенного рентгенологического исследования на примере снимка одного новорожденного показан на Рисунке 15.



**Рис.15 Рентгеновский снимок легких новорожденного с РНП**

Рентгенологическое исследование было проведено всем новорожденным с РНП. При ранних неонатальных пневмониях преобладали двусторонние (65,5%), или левосторонние пневмонии (34,5%). Происходит это, как известно, из-за того, что организм ребенка не способен сдерживать воспалительный процесс в границах одного сегмента. Кроме того, постоянное горизонтальное положение и широкие бронхи с тонкими альвеолярными перегородками только способствуют быстрому распространению инфекции на новые участки. Характер клинического течения РНП на основании рентгенологических данных представлен на Рисунке 16.

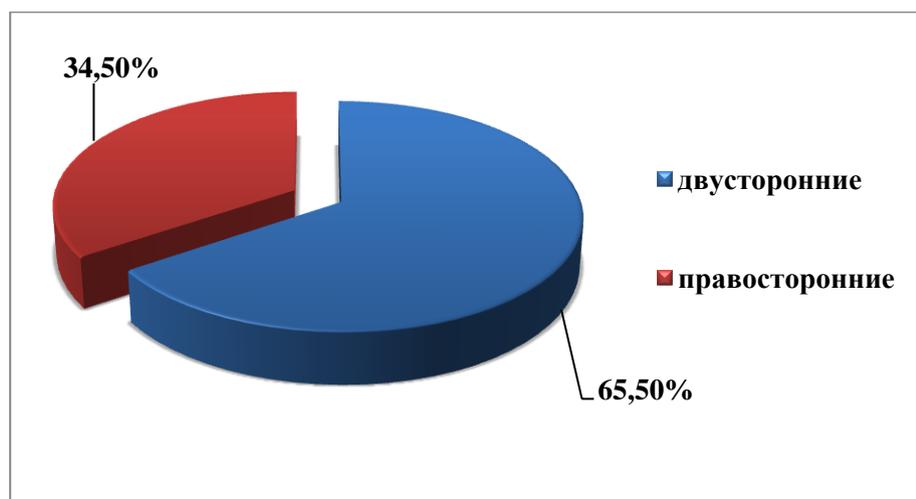


Рис.16 Рентгенологические данные ранних неонатальных пневмоний

Как видно из рисунка, двусторонние пневмонии достоверно чаще преобладали, реже - правосторонние ( $p < 0,001$ ).

Нами проведено сравнительное изучение клинико-рентгенологических данных внутриутробных и ранних неонатальных пневмоний у новорожденных детей. Данные представлены в Таблице 7.

Таблица 7

### Сравнительный анализ клинических показателей при ВУП и РНП

Показатели \ Вид пневмонии	ВУП n=230 (100%)	РНП n=246(100%)
Реакция на осмотр:		
- беспокойный	27,5 %	<b>66,8 %</b>
- вялый	<b>72,5 %</b>	33,2 %
Температура:		
- нормальная	<b>92,1%</b>	<b>57,7 %</b>
- гипертермия	7,9 %	42,3 %
- гипотермия	-	
Врожденные рефлексы:		
- угнетены	<b>63,6%</b>	<b>68,3 %</b>
- ослаблены	36,4%	31,7 %

Кожные покровы:		
- бледно-серые	<b>52,6%</b>	<b>76,8 %</b>
- бледные с цианотичным оттенком	47,4%	23,2 %
- акроцианоз	<b>92,6%</b>	23,5 %
- центральный цианоз	-	<b>76,5 %</b>
Одышка	<b>96,5%</b>	<b>78,5%</b>
ИВЛ	<b>76,8%</b>	<b>76,8%</b>
ЧД:		
- тахипноэ	<b>89,5%</b>	<b>68,9%</b>
- брадипноэ	10,5%	31,1%

*Примечание* - достоверность различий между группами при  $p < 0,05$

Анализ данных приведенных в таблице показывает, что имеется ряд достоверных клинико-рентгенологических различий внутриутробных и ранних неонатальных пневмоний. Так, реакция детей на осмотр при внутриутробных пневмониях вялая - 72,5% , а при ранних неонатальных пневмониях – беспокойная 66,8 % ( $p < 0,01$ ).

Защитная реакция в виде гипертермии наоборот достоверно чаще в 42,3 % ( $p < 0,001$ ) определялась при ранних неонатальных пневмониях. Достоверным проявлением внутриутробных пневмоний является акроцианоз в 92,6% ( $p < 0,05$ ), а ранних неонатальных – центральный цианоз в 76,5 % ( $p < 0,01$ ).

Одышка с участием всей вспомогательной мускулатуры и высокой балльной оценкой дыхательной недостаточности по шкале Даунса с высокой степенью достоверности - 96,5% ( $p < 0,001$ ) преобладали при внутриутробных пневмониях. При них чаще и тахипноэ - 89,5% ( $p < 0,05$ ). Физикальные данные так же отличались. При обеих формах пневмоний чаще прослушивались ослабленное дыхание 10,5% и 31,1% соответственно ( $p > 0,05$ ), однако жесткое дыхание чаще прослушивалось при внутриутробных пневмониях 78,6% ( $p < 0,05$ ).

И в рентгенологической картине имелись различия этих двух видов пневмоний. Обширные воспалительные изменения в легких - сегментарные и двусторонние очаговые 29,8% и 28,4% соответственно ( $p < 0,001$ ) типичны для

внутриутробных пневмоний, а для ранних неонатальных – двусторонние в 65,5% и правосторонние – 34,5% ( $p < 0,001$ ).

Оценка основного рентгенологического признака - очаговые тени, как нами было установлено, в группе новорожденных с ВУП специфичность составила 96%, чувствительность – 26,4%. В группе новорожденных с РНП была аналогичная картина - специфичность этого признака также была высокой и составила 98%, однако чувствительность всего лишь 16,5%.

Это свидетельствует, прежде всего, о том, что данный признак не может быть основным критерием диагностики внутриутробных и ранних неонатальных пневмоний, так как его чувствительность невысокая, при очень высокой специфичности [34; 111].

Оценивая такой признак, как усиление бронхо-сосудистого рисунка на рентгенограмме легких у новорожденных как с ВУП (чувствительность 81,2%, специфичность 79%), так и РНП (чувствительность составила 69,2%, а специфичность 93,5%) можно утверждать, что данный рентгенологический признак имеет большее диагностическое значение, так как отражает стадию воспалительного процесса - отек и гиперемии [111].

Под чувствительностью подразумевалась доля положительных результатов диагностического теста (или присутствие клинического симптома) при наличии (верификации) пневмонии, когда признак не относит пациента к группе здоровых, под специфичностью - доля отрицательного результата диагностического теста (или отсутствие клинического симптома) в отсутствии болезни, когда признак не относит здорового ребенка к группе больных [34; 111].

### **3.3. Роль внутриутробных инфекций в развитии неонатальных пневмоний**

Достоверных данных об истинной распространенности ВУИ нет. Однако, согласно данным ряда исследований, инфекционные заболевания выявляют у 50–60% госпитализированных доношенных и 70% недоношенных новорожденных [68]. Основной причиной ВУИ являются инфекционные урогенитальные

заболевания матери, частота которых в структуре заболеваемости беременных сохраняется высокой в течение последних 10 лет и составляет 88–100 на 1000 беременных [69].

К сожалению, в настоящее время нет достоверных сведений о вероятности заражения плода от инфицированной матери, но риск инфицирования плода различными микроорганизмами, выделенными у матери, колеблется от 5 до 70%, а данные о частоте реализации инфекции у новорожденного недостаточны и крайне противоречивы [69].

Значительное распространение хронических инфекционно-воспалительных заболеваний у женщин фертильного возраста, исходное снижение неспецифической резистентности приводят к длительной персистенции патогенных возбудителей в организме беременных и росту частоты внутриутробного инфицирования, что, в свою очередь, обуславливает срывы адаптации у новорожденных и становится причиной увеличения у них числа инфекционных осложнений. Число детей с проявлениями внутриутробной инфекции, родившихся от женщин с инфекционно-воспалительными заболеваниями, не снижается, а, наоборот, растет, составляя сегодня от 10 до 58% [29].

С учетом вышеизложенного следует отметить, что в современных условиях резко возросла частота хламидийной, вирусной, микоплазменной и смешанной инфекции, диагностика и лечение которых представляет значительные трудности в связи с развивающейся устойчивостью к антибиотикам и особенностями ответных реакций организма.

Нами было проведено комплексное исследование 180 родильниц, входящих в группу риска с диагнозом хроническое ВУИ. Контрольную группу составили 56 женщин с физиологически протекающей беременностью. Помимо микробиологического (бактериоскопического, бактериологического) метода исследования, были использованы ПЦР на наличие ДНК возбудителей инфекций передаваемых половым путем (ИППП)- хламидии, микоплазмы, ЦМВИ, ВПГ.

Образцы клинического материала, выделенные из цервикального канала обследуемых женщин, с диагнозом хроническое ВУИ, были проанализированы на наличие специфических фрагментов ИППП.

Исходя из того, что виды семейства *Chlamydiaceae* отличаются между собой лишь различиями в нуклеотидной последовательности некоторых генов, становится очевидным, что диагностика возбудителя хламидийной инфекции возможна лишь при использовании метода ПЦР, мы определяли наличие ДНК *Chlamydia trachomatis* и *Chlamydophila pneumoniae*.

Так как хламидии не относятся к нормальным представителям микрофлоры человека, их обнаружение всегда указывает на наличие инфекционного процесса, а отсутствие клинических проявлений объясняется временным равновесием между макро- и микроорганизмами в условиях, ограничивающих воспроизводство последнего.

Известно, что инфицирование новорожденных зависит от длительности безводного периода и способа родоразрешения, при аспирации околоплодных вод и длительном контакте слизистых оболочек с инфицированной средой. Инфицирование хламидиями может происходить антенатально и во время родов и зависит от локализации и выраженности хламидийного воспалительного процесса у женщины. При его локализации в области шейки матки заражение плода происходит интранатально, а при поражении труб, эндометрия, децидуальной оболочки — антенатально в результате аспирации или попадания возбудителя на слизистые оболочки, в том числе вульвы, уретры [29].

Примерно у 50-75% детей, рожденных от инфицированных рожениц, развивается поражение одного или нескольких органов. Как правило, развитие хламидиоза у новорожденных во влагалище и прямой кишке протекает бессимптомно, у 15% детей, рожденных от инфицированных рожениц, обнаруживают субклинически протекающую инфекцию [29].

*Mycoplasma pneumoniae* и *Mycoplasma genitalium* - являются условно-патогенными для человека микроорганизмами. Персистируя в эпителиальных клетках и на их поверхности, микоплазмы способны вызывать различные

заболевания урогенитального тракта женщин: эндометриты, негонококковые уретриты. У новорожденных, которые инфицируются при прохождении родовых путей, микоплазмы чаще поражают клетки эпителия верхних дыхательных путей. Дальнейшее размножение *M. pneumoniae* в дыхательных путях часто приводит к развитию пневмонии.

Результаты обследования родильниц с ВУИ представлены на Рисунке 17.

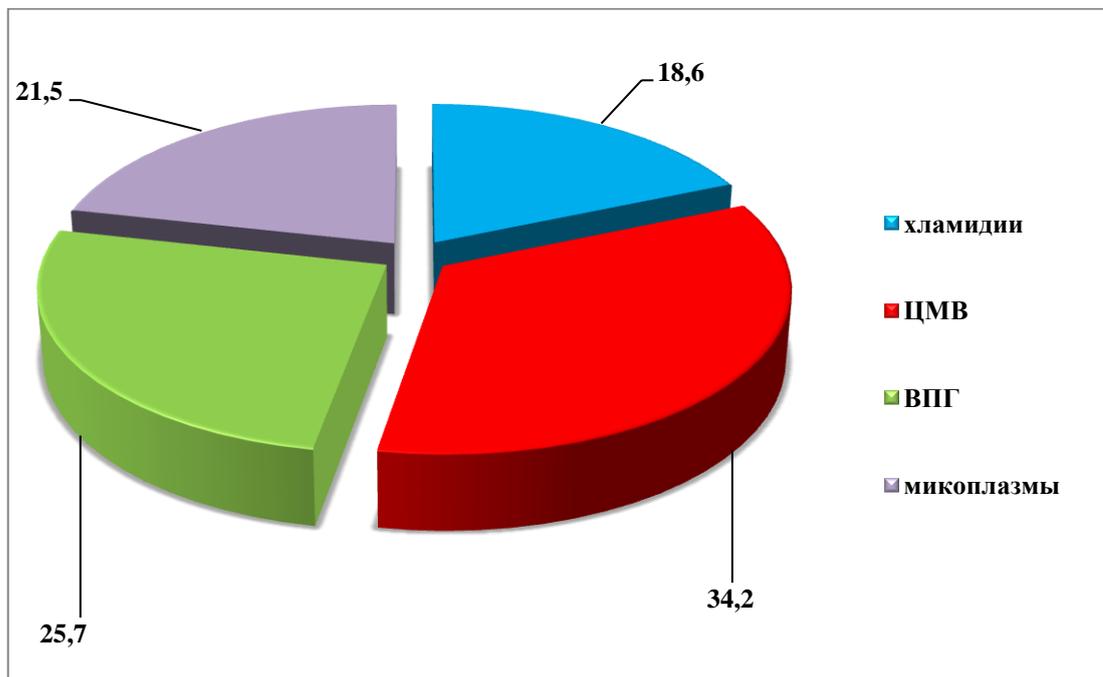


Рис.17 Распределение возбудителей ИППП у обследованных родильниц (%)

Как следует из представленных данных на рисунке, хламидии выявлялись в 18,6% случаев, микоплазмы в 21,5%, ВПГ – 25,7%, на ЦМВИ приходилось – 34,2% положительных находок. ВПГ и ЦМВИ у обследованной группы женщин, занимают доминирующее положение в развитии микст-инфекций.

У 132 из 180 женщин (73,3%) специфические антитела - Ig G к ЦМВИ суммарно были выявлены во всех группах.

Таким образом, инфицирование плода ЦМВИ у обследованных родильниц может происходить, как за счет первичного инфицирования с высоким риском

трансплацентарной передачи, так и при реактивации персистирующего вируса или суперинфекции. Данные полученные в нашем исследовании коррелируют с литературными источниками. Практически у всех обследованных женщин (98%) отмечается высокая частота вирусно-вирусных, вирусно-бактериальных инфекций.

Анализ полученных результатов, представленный на Рисунке 18, свидетельствует о том, что ЦМВИ чаще всего встречалась в виде микст – инфекции с *Chlamydomphila pneumoniae* (11,5%).

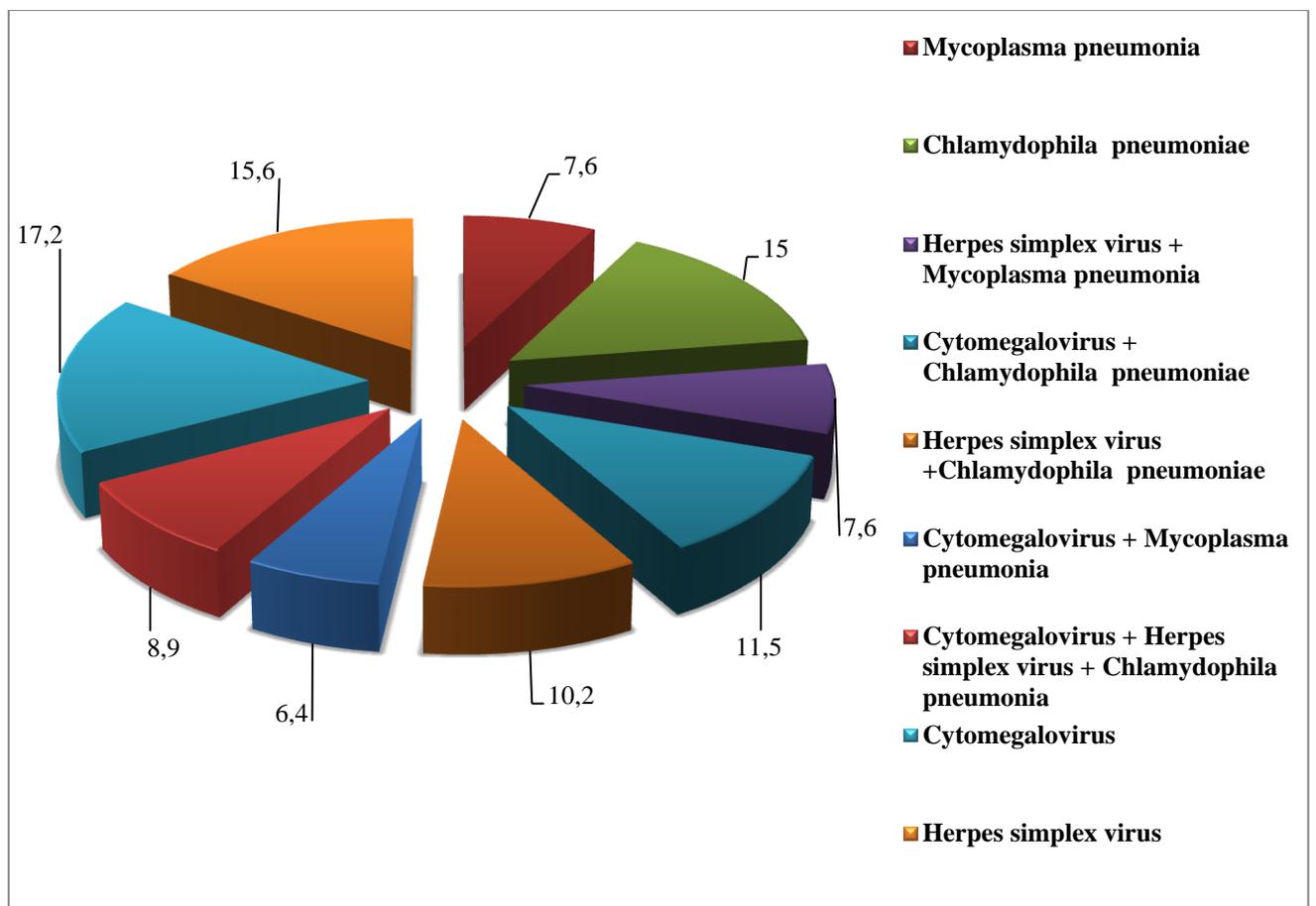


Рис. 18 Ассоциации возбудителей ВУИ у обследованных родильниц (%)

Как видно из рисунка, ЦМВИ и ВПГ инфекции были выявлены в 17,2 и 15,6% случаев соответственно. *Chlamydomphila pneumoniae* - в 15% случаев. *Mycoplasma pneumoniae* и сочетание *Herpes simplex virus* и *Mycoplasma pneumoniae* в 7,6%. Сочетание таких возбудителей ВУИ как *Herpes simplex virus* с

*Chlamydomphila pneumonia* и с *Cytomegalovirus* – в 8,9%, а *Cytomegalovirus* с *Mycoplasma pneumonia* только в 6,4% случаев.

Среди этиопатогенов ВУИ выделялась группа, связанная с формированием осложненного гинекологического и акушерского анамнеза у родильниц и инфекционной патологии новорожденных. Это так называемый TORCH-комплекс: токсоплазмоз (*T-Toxoplasma gondii*), краснуха (*R-Rubella*), цитомегалия (*C-CMV*), герпес (*H-Herpes symplex*) и др. Выявлена тенденция к возрастающей роли различных ассоциаций в развитии воспалительных заболеваний родильниц и новорожденных: бактериально-бактериальных, вирусно-бактериальных, вирусно-вирусных.

Такой признак, как отягощенный анамнез (острые или обострение хронических инфекционных заболеваний урогенитального тракта во время беременности или перед родами, длительный безводный промежуток и др.) обладает невысокой чувствительностью и специфичностью, поэтому учитывается только как фактор риска. С одной стороны, наличие только факторов риска еще не свидетельствует о наличии пневмонии, с другой стороны, отсутствие факторов риска не исключает развития пневмонии [34].

На следующем этапе было проведено обследование 230 новорожденных, родившихся у родильниц с наличием ВУИ.

Частота выделения представителей аэробной микрофлоры в мазках со слизистой зева и ТБА у новорожденных высокого инфекционного риска в момент рождения составила от 38,6% (в группе клинически здоровых новорожденных) до 61,4% (у детей с тяжелыми формами ВУИ). Для тяжелых форм ВУИ была характерна высокая частота контаминации новорожденных представителями инфекций, передающихся половым путем: ВПГ-2 — 17,4%, ЦМВИ — 27%, хламидии — 25,8%, микоплазма — 29,8 %.

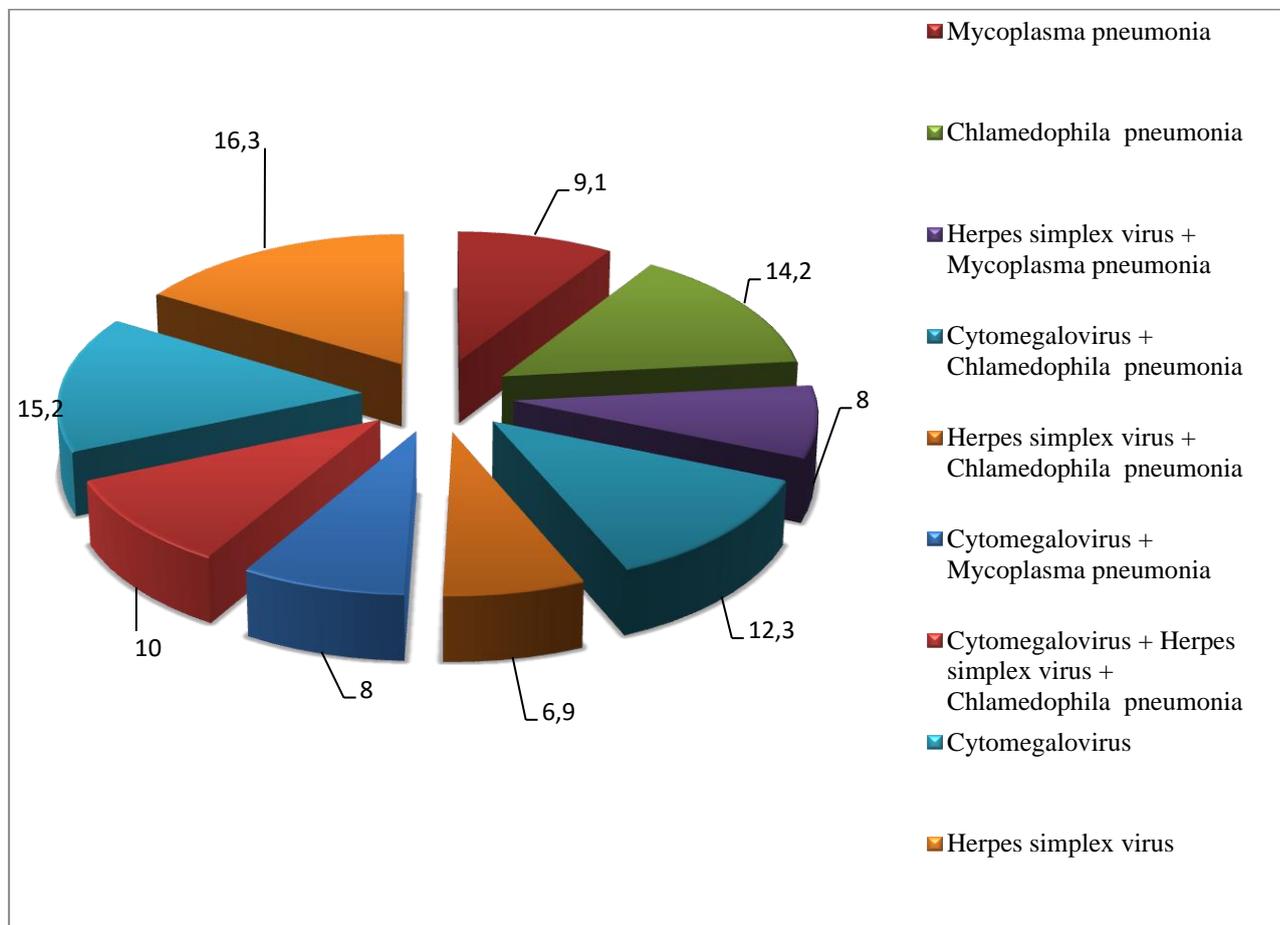
Диагностика хламидийной инфекции у новорожденных затруднена из-за особенностей течения, а также низкой концентрации возбудителя в исследуемых материалах, наличия перекрестных серологических реакций. Отрицательные ПЦР, в частности к хламидиям и микоплазмам, обусловлены тем, что возбудители

не проникают через маточно-плацентарный барьер, поэтому чаще инфицирование ими происходит в интранатальном периоде с более поздней манифестацией.

Как известно, внутриутробная пневмония может быть одним из специфических проявлений ВУИ и вызываться, помимо бактериальной флоры, другими микроорганизмами – вирусами, атипичной флорой, простейшими.

Соскоб с задней стенки глотки новорожденных и ТБА (n=230) проведен в 1 сутки рождения.

На Рисунке 19 представлены этиопатогены и их ассоциации у новорожденных с диагнозом ВУП и диагнозом хроническое ВУИ у родильниц.



**Рис.19 Ассоциации возбудителей ВУИ у обследованных новорожденных с диагнозом ВУП (%)**

Как видно из рисунка, наиболее часто встречающейся инфекцией у новорожденных, является ВПГ, вызванная *Herpes simplex virus* – в 16,3% случаев.

Известно, что среди новорожденных легочная форма, в частности ВУП, является наиболее тяжелой клинической формой ВУИ, с большим процентом осложнений и летальных исходов, в связи, с чем нами было уделено повышенное внимание изучению ТБА с данной патологией.

Так в 1/3 случаев в клинике ВУИ превалировала внутриутробная пневмония хламидийной (14,2%), ЦМВ-хламидийной (12,3%) и ЦМВИ - микоплазменной этиологии (8%), коррелирует с полученными клинико - рентгенологическими данными.

Исследования последних лет указывают на возрастающую роль в развитии бронхолегочных заболеваний у детей «атипичных» пневмотропных возбудителей, таких как *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* и др.

По клинико-морфологическим признакам эти инфекции сходны с заболеваниями, вызванными условно-патогенными микроорганизмами, но трудно диагностируются. Это определяет необходимость совершенствования клинико-лабораторной диагностики ВУИ у новорожденных, что особенно важно для быстрой расшифровки неонатальных пневмоний.

Диагностика ВУИ, где этиопатогеном могут выступать трудно-культивируемые возбудители, возможна только в условиях специализированных лабораторий, где используются принципиально новые современные и высокочувствительные методы детекции такие, как ПЦР, ИФА, с целью уточнения изменений в этиологической структуре неонатальных пневмоний.

Так, например, при обследовании образцов ТБА и мазков из зева и отделяемого с ВДП у новорожденных с ВУП в первые дни исследования ДНК *M.pneumoniae* определена в 2,5% случаев, а *Cl.pneumoniae* - в 8,9%. Принадлежность выявленных пневмотропных инфекционных агентов к виду *M.pneumoniae* и *Cl.pneumoniae* представленных в Таблицах 8 и 9, подтверждена ПЦР.

**Выявление прямых маркеров CMW, HSV, *M.pneumoniae*, *Cl.pneumoniae* и микст-инфекций у новорожденных с ВУИ**

Группы новорожденных	ДНК (ПЦР)				
	CMW	HSV	<i>M.pneumoniae</i>	<i>Cl.pneumoniae</i>	микст - инфекции
с ВУИ (n=230)	49 (21,3%)	58 (25,2%)	8 (9,1%)	18 (20,6%)	87 (37,8%)
контрольная (n=103)	8 (7,7%)	4 (3,8%)	-	4 (3,8%)	4 (3,8%)

*Примечание* - достоверность различий между группами при ( $p < 0,001$ )

Анализ данных показал, что ДНК изученных инфекций выявлена во всех группах, в том числе у детей без признаков ВУИ. Так, наиболее часто ДНК CMW и HSV выявлялась в группе с ВУИ чаще ( $p < 0,001$ ), чем в других группах, а ДНК *M.pneumoniae* не выявлялась в группах среди новорожденных без ВУИ и контрольной.

**Результаты ПЦР индикации респираторного микоплазмоза и хламидиоза у новорожденных с ВУП**

Группы новорожденных	ДНК <i>M.pneumoniae</i>		ДНК <i>Cl.pneumoniae</i>	
	количество положительных находок			
	абс.	%	абс.	%
новорожденные с ВУП и ВУИ (n=230)	18	7,8	21	9,1
контрольная (n=103)	-	-	17	16,5

*Примечание* - достоверность различий между группами при ( $p < 0,001$ )

Как видно из таблицы, при изучении ДНК *M.pneumoniae* выявлены в 7,8% случаев, а ДНК *Cl.pneumoniae* у 9,1% обследованных новорожденных с ВУП и с диагнозом хронической ВУИ у родильниц. В группе обследованных без признаков ВУИ ДНК *M.pneumoniae* не обнаружены ни в одной пробе, тогда как ДНК *Cl.pneumoniae* в 16,5% случаях.

Полученные данные могут свидетельствовать о том, что выявленные методом ПЦР инфекции могут быть причиной ВУП у обследованных новорожденных с лабораторно не подтвержденным диагнозом, но с типичными клиническими проявлениями легочной патологии.

Учитывая полученные результаты, можно сделать вывод о диагностическом значении метода ПЦР для выявления *M.pneumoniae* и *Cl.pneumoniae* в мазках со слизистой зева и ТБА от новорожденных с ВУП.

Развитие ВУП, тяжесть, локализация и распространенность патологического процесса, а также исход возникшей патологии определяются видом возбудителя, его патогенностью и тем, какими путями микроорганизмы проникли от матери к плоду.

Следовательно, инфекции плода и новорожденного формируются под влиянием многих факторов, в том числе и воспалительные заболевания матери, и как следствие, микробная антенатальная и интранатальная колонизация околоплодных вод, плаценты, пуповины плода и соответствующие изменения иммунной системы новорожденного ребенка.

Требованиям актуальной этиологической диагностики пневмоний, к сожалению, не удовлетворяет серологическое типирование ряда пневмотропных инфекций (в частности, микоплазменной, хламидиозной и др.).

Несмотря на высокую специфичность (89,6%) и чувствительность (78,6%) данного диагностического подхода (обычно используются ИФА или ИФМ), положительный результат может быть получен в лучшем случае лишь к исходу 4-й недели от начала заболевания, когда удастся продемонстрировать четырехкратное и более нарастание титра специфических антител.

Такие признаки, как рост и идентификация возбудителя в ТБА, в крови, мазках из зава имеют низкую чувствительность и высокую специфичность. Это связано с рядом технических проблем по забору биоматериала, независимо от метода выявления микроорганизмов (микробиологический метод, ПЦР и др.).

Эти признаки могут использоваться в диагностике пневмонии в учреждениях более высокого уровня оказания медицинской помощи новорожденным детям [34].

Далее, с целью подтверждения внутриутробного характера развития пневмоний у новорожденных и дифференциации ВУП от РНП, а также для оценки санитарного состояния родильного стационара, нами было проведено санитарно-микробиологическое исследование воздуха, медицинского оборудования и изучено микробное носительство среди медицинского персонала ОРИТН.

## ГЛАВА 4. ЗНАЧЕНИЕ САНИТАРНО-ПОКАЗАТЕЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В РАЗВИТИИ НЕОНАТАЛЬНЫХ ПНЕВМОНИЙ

Значительное место в системе эпидемиологического надзора за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи (ИСМП), - это микробиологический мониторинг. Микробиологический мониторинг представляет собой комплексное и динамичное наблюдение патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, выделенных у пациентов, персонала и учреждений больничной среды медицинской организации, их свойств и особенностей кровообращения [82].

Регистрация случаев ИСМП - это инструмент, который позволяет проводить качественную эпидемиологическую диагностику и оценивать эффективность принимаемых мер. В то же время действующие координационные направления ориентированы на мониторинг качества обеззараживающих и стерилизационных мероприятий и не направлены на своевременное обнаружение госпитальных штаммов, которые определяют эпидемиологическое состояние в больницах [57].

Значительные макроэкономические издержки при микробиологическом мониторинге и дефицит надлежащей рентабельности диктуют потребность его оптимизации с точки зрения улучшения лабораторных методов диагностики случаев ИСМП и действенного поиска внутрибольничных штаммов [28].

Результаты местного микробиологического мониторинга часто являются стандартами развития процессов динамики микробного спектра и степени устойчивости к антибиотикам наиболее важных микробных агентов ИСМП [57].

Ущерб, наносимый ИСМП в Российской Федерации, имеет только не абсолютные показатели. Так, по данным российских ученых Покровского В.И., Акимкина В.Г. (2011) любой факт ИСМП множит присутствие пациента в больнице в среднем на 10 дней; стоимость их лечения увеличивается 3-4 кратно. Общий годовой экономический убыток от ИСМП составляет 10-15 млрд. рублей [82].

Самая высокая частота ИСМП отмечается у пациентов в отделении интенсивной терапии (ОРИТ). Согласно исследованиям ведущих эпидемиологических клиник, доля ИСМП варьирует от 5% до 48% и чем в других отделениях, в 5-10 раз выше [28]. Основанием для этого является концентрация на локальной территории тяжелых пациентов и сотрудников отделения, частое использование инвазивных методов исследования (интубация трахеи с последующим подключением ИВЛ, использование разного рода катетеров и т. д.); высокая агрессивность микробиоты в ОРИТ, парентеральное питание; ослабление иммунного статуса, использование различных лекарств и др. [116].

Из-за позднего выявления и регистрации ИСМП, значительного ущерба, причиненного этими заболеваниями для здоровья новорожденных, для изучения закономерностей возникновения и распространения нозокомиальных инфекций мы провели исследование санитарно-гигиенического фона родовспомогательного учреждения.

Данные литературы последних лет показывают, что в этиологической структуре нозокомиальных инфекций произошли некоторые изменения [28; 82]. Состояние нозокомиальной среды в значительной степени определяет вероятность развития ИСМП.

Резервуар условно-патогенных микроорганизмов в клинике - пациенты и носители, включая персонал. Тем не менее, высокая устойчивость УПМ в окружающей среде предполагает как воздушно-капельный, так и контактно-бытовой путь передачи микроорганизмов [28; 57].

В соответствии с приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 691 от 28.12.1989 «О предупреждении ВБИ в акушерской больнице» и Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 26.11.1997 № 345 «Об улучшении мер по предотвращению ВБИ в акушерских больницах», МУ 4.2.2942-11 (2011), санитарно-гигиенический фон больницы определяется загрязнением воздуха и объектов внешней среды (поверхности оборудования, инвентаря, медицинские изделия, а также руки персонала и

родильниц) с помощью санитарно-показательных микроорганизмов, включая стафилококки (воздушная среда больницы определяется по содержанию *S.aureus* на 1 м<sup>3</sup> воздуха, смывы с объектов окружающей среды регулируются по содержанию *Staphylococcus spp.* на площади 10 см<sup>2</sup>).

#### **4.1. Санитарно-бактериологическое исследование воздушной среды родильного стационара**

В серии исследований нами проведена качественная и количественная (подсчет общего количества колониеобразующих единиц (КОЕ)) оценка бактериальной загрязненности воздушной среды родильного дома на присутствие санитарно-показательных микроорганизмов.

Проведено бактериологическое исследование воздушной среды родильного отделения ГБУ РД «РКБ». 128 образцов воздуха анализировали методом седиментации с использованием устройства Кротова до начала работы во время и после процедур. Из приведенных данных можно сделать вывод о том, что для послеродовых отделений главными путями распространения микроорганизмов, возбудителей ИСМП, являются воздушно-капельное и воздушно-пылевое инфицирование.

Было обнаружено, что в совокупности 94 образца (73,4%) были положительными. Из них коагулазоотрицательная кокковая микробиота была выделена в 52 случаях (55,3%). Другие виды патогенов составили 42 (44,6%) положительных результатов.

Результаты исследования бактериального загрязнения родовспомогательного учреждения ГБУ Республики Дагестан "Республиканская клиническая больница" с учетом этиологической роли микроорганизмов разных видов представлены в таблице 10.

**Микробиологическое исследование воздушной среды ОРИТН родильного дома**

Отделения	Исследование воздуха			
	количество положительных находок			
	Грам + кокки		другие	
	абс.	%	абс.	%
Родильный блок	2	9,0	2	11,1
послеродовое	<b>4</b>	<b>18,1</b>	<b>4</b>	<b>22,2</b>
операционная	2	9,0	1	5,5
новорожденных	<b>5</b>	<b>22,7</b>	<b>4</b>	<b>22,2</b>
ОРИТН	3	13,6	3	16,6
патологии	<b>6</b>	<b>27,2</b>	<b>4</b>	<b>22,2</b>

*Примечание* - достоверность различий между группами при  $p < 0,05$

Как видно из приведенных данных, доминирующими микроорганизмами микрофлоры воздуха в родильном доме ГБУ РД «РКБ» являлись кокки. Выделяемые часто микрококки, плесневые и дрожжеподобные грибы следует классифицировать как сапрофитную микрофлору, которая не играет решающей роли в развитии инфекционного процесса. Эта флора может вегетировать в полости рта или носоглотке персонала и родильниц. С воздушным потоком микроорганизмы могут переноситься и оседать на стерильных инструментах и на оборудовании.

В процессе изучения состояния воздушной среды вычисляли общее микробное число (ОМЧ). Забор материала производили до начала, и в процессе работы родильного дома ГБУ РД «РКБ».

Так, в родильном зале КОЕ до начала работы составляло 85-100 мкл/мл, а во время работы замеры показали следующие значения – 200-250 мкл/мл, что является относительной нормой для этих помещений. Что касается палат ОРИТН, палат новорожденных, процедурных, перевязочных, комнат для сбора и

пастеризации молока КОЕ составляло в среднем, до начала работы 80-150 мкл/мл, а во время работы около 200-300 мкл/мл, что также является нормой бактериальной обсемененности воздуха для родильных стационаров. Данные представлены в Таблице 11.

Таблица 11

**ОМЧ в 1м<sup>3</sup> воздуха отделений родильного отделения ГБУ Республики Дагестан "Республиканская клиническая больница"**

Обследованные объекты ОРИТ	Общее микробное число		
	обсемененность воздуха, КОЕ		
	до работы М±м	во время работы М±м	после окончания выполнения процедур М±м
родблок	80±15	135±25	215±30
послеродовое	130±10	180±30	260±35
операционная	170±20	250±25	330±25
новорожденных	120±15	280±35	325±30
ОРИТ	165±20	390±45	450±35
патологии	130±10	180±30	260±35

*Примечание* - достоверность различий между группами при  $p < 0,05$

Таким образом, многократное обследование воздуха (94 пробы) различных отделений родильного стационара ГБУ РД «РКБ» показало, что санитарное состояние этих типов помещений удовлетворительное, микробное число не превышает допустимые нормы. Санитарно-показательные микробы высевались крайне редко и в единичных случаях.

Учитывая результаты изучения микрофлоры воздуха, представляет интерес определение микробиоты окружающей среды родильного стационара ГБУ РД «РКБ», так как в таких стационарах пациенты практически изолированы, и источником дополнительной инфекции для них являются объекты внешней среды и медицинский персонал.

## 4.2. Изучение микробиоты объектов внешней среды родильного дома РКБ

Рассматривая акушерский стационар как открытую экологическую систему, состояние которой формируют три компонента: внешняя среда, пациенты и персонал, сложившаяся практика эпидемиологического надзора выбирает из этой системы две наиболее динамичные составляющие «персонал» и «пациенты», в меньшей степени уделяется внимание отдельным составляющим больничной среды [28; 57].

На объектах окружающей среды может происходить размножение и накопление отдельных видов условно-патогенных микроорганизмов, что способствует сохранению госпитальной микрофлоры и ее распространению [28; 57].

Большое значение в инфицировании условно-патогенными микроорганизмами имеют лечебные и диагностические инструменты и оборудование, в том числе аппарат ИВЛ, наркозные маски, трахеостомические трубки, катетеры различного назначения, а также сухие и влажные поверхности госпитальной среды, инфицирование которыми возникает из-за несоблюдения правил стерилизации и дезинфекции [28].

С целью выявления этого фактора инфицирования условно-патогенной микробиотой нами было проведено бактериологическое исследование смывов, взятых с различных объектов родильного стационара ГБУ РД "РКБ".

Из изученных 62 образцов с сухих поверхностей, положительный результат отмечали в 34 (54,8%) случаях.

С влажных поверхностей частота положительных посевов составила 34, из которых в 19 (55,9%) случаях выделялась грамотрицательная микробиота, а грамположительная составила 15 (44,1%) случаев.

Результаты бактериологического исследования смывов с объектов медицинского оборудования представлены в Таблице 12.

**Результаты бактериологического исследования смывов с медицинского оборудования ОРИТН родильного дома РКБ**

Объекты	Количество смывов			
	общее число исследований		количество положительных находок	
	абс.ч.	%	абс.ч.	%
аппарат для отсасывания слизи	5	8,1	4	11,7
наркозный аппарат	4	6,4	2	5,8
пеленальный стол	3	4,8	2	5,8
весы для взвешивания новорожденных	5	8,1	3	8,8
набор для первичной и вторичной обработки новорожденного	2	3,2	-	-
лоток для приема новорожденного	5	8,1	3	8,8
кувез (внутренняя поверхность)	7	11,2	4	11,7
детское белье	3	4,8	-	-
контуры кислородной маски наркозного аппарата	<b>8</b>	<b>12,9</b>	<b>5</b>	<b>14,7</b>
аппарат искусственной вентиляции легких	<b>11</b>	<b>17,7</b>	<b>8</b>	<b>23,5</b>
стерильные бутылочки для грудного молока и питьевых растворов	3	4,8	-	-
смывы со стен и полов	6	9,7	3	8,8

*Примечание* - достоверность различий между группами при  $p < 0,05$

В нашем исследовании, по количеству положительных находок доминировали аппарат искусственного дыхания и контуры кислородной маски наркозного аппарата (23,5 и 14,7% соответственно).

Наибольшее значение для развития неонатальных пневмоний, в частности РНП из всех объектов внешней среды имеют аппараты ИВЛ.

Неудовлетворительные результаты бактериологического контроля с данной аппаратуры свидетельствуют о высоком риске внутрибольничного инфицирования пациентов.

При определении видового состава следует отметить довольно широкий спектр условно-патогенной микробиоты, отличающийся значительным видовым разнообразием. Видовой состав микроорганизмов представлен в Таблице 13.

Таблица 13

**Видовой состав микроорганизмов, выделенных из смывов с медицинского оборудования ОРИТН родильного**

Вид	Количество выделенных штаммов	
	абс. число	%
количество обследованного материала	62	100
положительный результат	34	54,8
<i>S. aureus</i>	2	5,8
<i>S.epidermidis</i>	8	23,5
<i>S.saprophyticus</i>	3	8,8
<i>E.coli</i>	4	11,7
<i>Enterobacter</i>	4	11,7
<i>Edwardsiella</i>	2	5,8
<i>Klebsiella spp.</i>	5	14,7
<i>Proteus</i>	2	5,8
<i>P.aeruginosa</i>	2	5,8
<i>C. albicans</i>	2	5,8

*Примечание* - достоверность различий между группами при  $p < 0,05$

Как видно, представленных в таблице 13 данных по количеству положительных посевов доминировали *S.epidermidis* (23,5 %).

Из 34 положительных находок полученных при исследовании 62 смывов с медицинского оборудования и инвентаря суммарно доминировали

граммотрицательные микроорганизмы – 61,7%, тогда как на долю грамположительных микробов приходилось – 38,2% ( $p < 0,05$ ). Такой качественный состав характерен для микробиологического фона при обследовании медицинского оборудования родовспомогательного стационара и коррелируют с ранее проведенными нами санитарно-бактериологическими исследованиями в родильном доме ГБУ РД «РКБ» и данными литературы.

#### **4.3. Определение микробного носительства среди медицинского персонала ОРИТН родильного дома**

Медицинские работники являются контингентом высокого риска инфекционного заражения как условно-патогенными, так и патогенными микроорганизмами. Инфицированию медицинского персонала способствует своеобразие экологических условий медицинских организаций (госпитальный микробный пейзаж, ускорение темпов эволюции возбудителей ИСМП, концентрация ослабленных лиц на ограниченной территории), наличие большого числа источников возбудителя инфекции (больных и носителей) среди пациентов, нарастающий объем инвазивных вмешательств, увеличивающих риск заражения персонала через кровь и другие биологические жидкости [82].

С этой целью нами было проведено санитарно-микробиологическое исследования медицинского персонала родильного дома ГБУ Республики Дагестан "Республиканская клиническая больница" на носительство патогенных микроорганизмов.

Верхние дыхательные пути (ВДП) являются наиболее частым биотопом, в котором отмечается носительство патогенов, а слизистая передней части носовых ходов рассматривается как место, где происходит колонизация микроорганизмов.

Известно, что развитию носительства *S.aureus* в ВДП способствует личная и семейная предрасположенность. Этим, наверное, и можно объяснить то, что среди медицинского персонала, работающего в одних и тех, же

условиях, носителями *S.aureus* являются не все медицинские работники ГБУ РД «РКБ» [126; 150].

В условиях лечебных учреждений медицинский персонал составляет обширный и постоянно действующий круг источников обсеменения патогенными стафилококками, поддерживающих циркуляцию этих микроорганизмов в отделениях стационара.

С целью выявления носительства *S.aureus* среди медицинского персонала родильного дома было обследовано 29 медицинских работников (врачи, средний и младший медперсонал), которые имели постоянный контакт с новорожденными.

В ходе проведения исследования было установлено, что носительство *S. aureus* наиболее было распространено среди врачей в ОРИТН – 37,5%, в родблоке и в палатах новорожденных этот показатель составил – 25%, в послеродовом отделении – 12,5%.

У медицинских сестер в ОРИТН в 33,3% случаев, у акушерок послеродового отделения в 27,7%, а у акушерок родильного блока микроорганизмы выделялись в 22,3%, несколько меньше у медсестер палат новорожденных 16,7%. Показатели носительства *S.aureus* у младшего медперсонала статистически не отличались от показателей среднего медперсонала.

Анализ выделения *S. aureus* из ВДП медицинского персонала ГБУ РД «РКБ» представлен в Таблице 14.

**Выделение *S. aureus* в мазках со слизистой ВДП медицинского персонала  
родильного дома РКБ**

Обследованные группы медицинского персонала	Число проб	Высеваемость <i>S. aureus</i> по отделениям родильного дома			
		родблок	После родовое отделение	ОРИТН	палаты новорожденных
врачи	24	6	3	<b>9</b>	6
	%	25	12,5	<b>37,5</b>	25
средний медперсонал	36	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	6
	%	<b>22,3</b>	<b>27,7</b>	<b>33,3</b>	16,7
младший персонал	27	7	6	6	<b>8</b>
	%	25,9	22,2	22,2	<b>29,6</b>

*Примечание* - достоверность различий между группами при  $p < 0,05$

Как видно из таблицы 14, показатели носительства *S. aureus* у сотрудников отделения реанимации и интенсивной терапии новорождённых ГБУ РД «РКБ» оказались выше, чем в других отделениях, что объясняет доминирующий характер выделенной флоры в этиологической структуре пневмоний у новорожденных, находящихся в ОРИТН ГБУ РД «РКБ» ( $p < 0,05$ ).

Вторым существенным фактором передачи микроорганизмов в отделениях родильного дома являются руки медицинского персонала. Особую опасность представляют длительная колонизация кожи больничными штаммами и ситуации, когда кожная ареактивность сочетается с выделением с кожи и очага поражения как грамположительной, так и грамотрицательной микробиоты.

Известно, что постоянное использование антисептиков для обработки рук снижает количество микроорганизмов, в частности транзитных, так как многие химические вещества, входящие в состав антисептиков обладают коммулятивным эффектом.

С целью выявления носительства патогенной микробиоты медперсоналом ОРИТН роддома ГБУ РД «РКБ» (n = 58), нами был проведен анализ, в котором изучался качественный и количественный состав микробиоты кожи рук до начала работы и в течение рабочего дня. Результаты, полученные в исследовании смывов с рук медицинского персонала, представлены в таблице 15.

Таблица 15

**Результаты бактериологического исследования смывов с рук медицинского персонала ОРИТН родильного дома**

Категории обследованных	Число проб	Выделенные микроорганизмы	Высеваемость, абс.ч./%
врачи акушеры - гинекологи	15	<i>S.epidermidis</i>	<b>5/33,3</b>
средний медперсонал (акушерки, медсестры)	24	<i>S.epidermidis</i>	<b>7/29,2</b>
		<i>E.coli</i>	3/12,4
младший персонал	19	<i>S.epidermidis</i>	<b>6/31,6</b>
		<i>E.coli</i>	4/21
		<i>Proteus spp.</i>	2/10,5
		<i>P. aeruginosa</i>	1/5,2

*Примечание* - достоверность различий между группами при  $p < 0,05$

Как видно из таблицы 15, количественный и качественный состав микробиоты кожи рук варьировал у различных групп медицинских работников. Суммарное количество микроорганизмов колебалось в широких пределах: от 0 до  $10^{-10}$  КОЕ.

После мытья на руках медперсонала родильного дома определяли бактерии в меньшем количестве, но при этом изменялся и видовой состав выделенных микроорганизмов.

В результате при бактериологическом исследовании кожи рук врачей акушеров-гинекологов высевали только культуру *S.epidermidis* в 33,3% случаев. У акушерок родильных блоков была выделена культура *S.epidermidis* в 29,2%, *E.coli* - в 12,4% случаев.

При исследовании смывов с кожи рук младшего персонала видовой состав микроорганизмов представлен более широко - *S.epidermidis* была выделена в 31,6%, *E.coli* - 21%, *Proteus spp.* - в 10,5%, *P.aeruginosa* - в 5,2 % случаев.

Выделение культуры *S.epidermidis* наблюдалось у разных категорий медицинского персонала, что позволяет говорить о возможной циркуляции этого микроорганизма. Такие микроорганизмы как *Proteus spp.* и *P. aeruginosa* выделялись значительно реже, чем *E.coli*, однако различия в частоте обнаружения этих бактерий статистически недостоверны.

Существенным фактором риска развития ранних неонатальных пневмоний является длительное (резидентное) носительство больничных штаммов, особенно когда их доля в кожной популяции доминирует.

В результате установлено, что микробиота обнаруживаемая на руках медперсонала ОРИТН РД ГБУ «РКБ», соответствует профессиональным обязанностям, выполняемым ими. У медицинского персонала, только что обслуживавших новорожденных, *S.epidermidis* обнаруживался чаще, чем у тех, кто только что вымыл руки, либо у тех, кто не выполнял лечебных процедур или выполнял работу не связанную с непосредственным уходом за родильницами и новорожденными ( $p < 0,05$ ).

Следует отметить также, что заражение грамотрицательной микробиотой возможно на уровне послеродового отделения и основными носителями этой микробиоты на коже рук является средний и младший медперсонал ГБУ РД «РКБ». Это, по нашему мнению, связано с несоблюдением правил гигиены, а также низким уровнем профессиональной подготовки.

Наши исследования подтвердили, что колонизация кожных покровов рук *S.epidermidis* является отражением защитных возможностей организма, а степень колонизации - объективным показателем предрасположенности к осложненному течению инфекции, в частности, неонатальных пневмоний.

Таким образом, по результатам проведенных бактериологических исследований можно сделать вывод, что рост удельного веса условно-патогенной микрофлоры в этиологической структуре ранних неонатальных пневмоний

напрямую зависит от инфицирования кожи рук медперсонала, обсемененности аппаратуры медицинского назначения, в частности аппарат ИВЛ, которые недостаточно стерилизуются и дезинфицируются.

## ГЛАВА 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ НЕОНАТАЛЬНЫХ ПНЕВМОНИЙ

Невзирая на достижения, относящиеся к созданию и внедрением новых информативных методов диагностики, остается большое число необследованных женщин, и как результат, высокий процент перинатальной заболеваемости и смертности [75]. На настоящий момент очевидно значение внутриутробных инфекций (ВУИ) в перинатальной патологии, детской заболеваемости и смертности, т.к. нарушения адаптивно-компенсаторных механизмов организма приводит к снижению его иммунного статуса [113]. В соответствии с результатами ряда исследователей, частота ВУИ среди детей, родившихся жизнеспособными, находится в пределах от 27,4% до 70%, среди недоношенных детей. В структуре ранней неонатальной смертности ВУИ, наряду с врожденными пороками развития, занимают лидирующее место и достигают 25% [34].

Течение инфекционного заболевания плода, тяжесть поражения, локализация и распространенность патологического процесса, темпы его реализации, а также исход возникшей патологии определяются видом возбудителя, его вирулентностью тропизмом к тканям плаценты и плода, а также тем, какими путями микроорганизмы проникли от матери к плоду. Основную роль в таком случае играет состояние защитного потенциала родильницы и способности плода к иммунному ответу. Для реализации пренатального инфицирования важен срок беременности, на момент которого плод инфицировался, особенно вирусами [77].

Знаменитый постулат гласит, что между степенью инфекционного процесса у родильницы и плода нет параллелизма. К тяжелым поражениям плода или к его гибели может привести легко или даже латентно протекающий инфекционный процесс у беременной. Это явление в большей мере определено тем, что у зародыша высокий уровень метаболизма и биоэнергетики, что является оптимальной средой для репродукции микроорганизмов. Этим и трактуется

принципиальная общность эмбрио - и фетопатий, обусловленных разнообразными микроорганизмами [77].

Безусловно, видовой состав возбудителей пневмоний варьируется, и зависит от множества экологических риск-факторов. Это в свою очередь, усугубляет, прежде всего, мониторинг течения, диагностирование, скрининг и проведение этиотропной терапии заболевания.

### **5.1. Микробиологическая диагностика внутриутробных пневмоний**

Микробиологическое исследование используется для выявления развития микроорганизмов с последующим типированием и установлением видоспецифичности, а также для дальнейшей постановки антибиотикограммы. При подозрении на пневмонию анализ проводился в первые часы жизни.

Зачастую инфекционный агент остается нераспознанным, в особенности при взятии материала для бактериологического исследования после начала этиотропной терапии. Возбудители, выделенные из зева, кишечника, верхних дыхательных путей, порой не всегда можно считать причиной развития заболевания.

Так, по данным Н.П. Шабалова [116], высеянный из зева микроорганизм лишь в 25—30% случаев служит истинным возбудителем пневмонии. Через 3 дня повтор бактериологического посева проводился с целью микробиологического мониторинга и определения чувствительности к антибиотикам.

В случае если, несмотря на проведение антибактериальной терапии, наблюдали неблагоприятную динамику клинической картины (наличие дыхательных нарушений, терморегуляции и др.) выполнялся посев крови на стерильность, а также повторяли бактериологический посев из зева.

Для определения диагностической значимости микробиологического метода проведен ретроспективный анализ историй болезни 70 новорожденных различного срока гестации, родившихся больными и заболевших в течение первых суток жизни.

У всех детей ОРИТН родильного дома отмечались дыхательные нарушения

различной степени.

В дальнейшем пневмония была диагностирована у 39 (56%) новорожденных ОРВИ, у 25 пациентов (35%) - РС, у 4 (6%) - конъюнктивит, у 2 детей (3%) - сепсис. Среди детей обследованной группы недоношенными родились - 50 (72%), доношенными - 20 (28%) новорожденных, 42 (85%) новорожденных родились в асфиксии различной степени тяжести. В респираторной поддержке нуждались 48 (68%) новорожденных. У всех детей, проводили микробиологическое исследование.

В качестве биологического материала для бактериологического исследования использовали: мазок из зева, отделяемое из ВДП новорожденных ОРВИ родильного дома

У всех обследованных новорожденных были изолированы различные микроорганизмы условно-патогенной микробиоты. Данные представлены в Таблице 16.

Таблица 16

**Видовой состав микроорганизмов, изолированных из зева и ВДП новорожденных**

Виды микроорганизмов	Частота выделения из исследованных биотопов			
	Зев		ВДП	
	абс. цифры	%	абс. цифры	%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12	17,6	3	12,5
<i>Staphylococcus cohnii</i>	8	11,8	9	37,5
<i>Staphylococcus warnerii</i>	5	7,3	-	-
<i>Streptococcus oralis</i>	7	10,3	6	25,0
<i>Streptococcus mitis</i>	8	11,8	3	12,5
<i>Neisseria sicca</i>	7	10,3	-	-
<i>Neisseria mycosa</i>	6	8,8	-	-
<i>Corynebacterium xerosis</i>	7	10,3	3	12,5
<i>Enterococcus faecalis</i>	8	11,8	-	-

Примечание - достоверность различий между группами при  $p < 0,05$

Как следует из представленных данных, микробиота ВДП и зева была представлена условно-патогенными бактериями. Превалировали бактерии родов *Staphylococcus spp.* (*S. epidermidis* 17,6%) и *Streptococcus spp.* (*Streptococcus mitis* – 11,8%).

Далее проводили проспективное исследования. В группе наблюдения с диагнозом «внутриутробная пневмония» включили 230 новорожденных ОРИТН родильного дома.

В качестве биологического материала от новорожденных для бактериологического исследования использовали: кровь, ТБА, мазок из зева, отделяемое из ВДП новорожденных.

Для установления этиологической структуры внутриутробных пневмоний на современном этапе проведено комплексное микробиологическое исследование.

Из 230 обследованных новорожденных у 213 (87,5%) бактериологический посев был положительным. Анализ полученных данных показал, что данные проспективного исследования коррелируют с исследованиями, проведенными ретроспективно. *S. epidermidis* являлся доминирующим микроорганизмом в обоих исследованиях (17,6 и 17,1% соответственно). Данные исследования представлены в Таблице 17.

**Результаты микробиологического исследования новорожденных  
с ВУП (n= 230)**

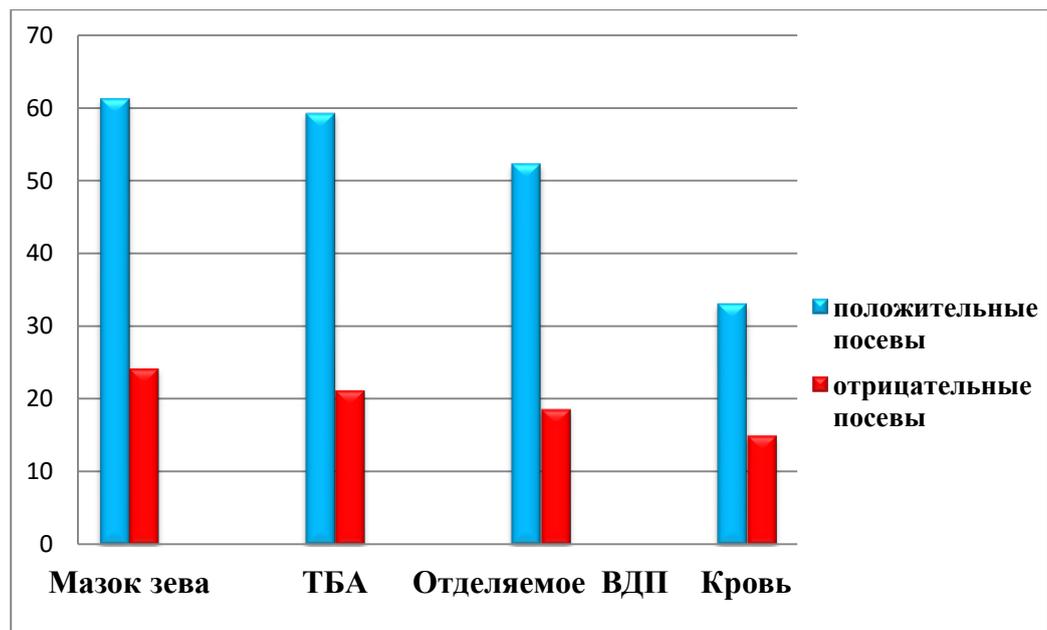
Виды микроорганизмов	Исследованный материал							
	мазок из зева		отделяемое ВДП		ТБА		кровь	
	абс. цифры	%	абс. цифры	%	абс. цифры	%	абс. цифры	%
<i>Escherichia coli</i>	4	2,8	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	4	2,8	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	<b>14</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>8,1</b>	<b>13</b>	<b>10,1</b>	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<b>16</b>	<b>11,4</b>	<b>26</b>	<b>20,9</b>	<b>13</b>	<b>10,1</b>	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<b>13</b>	<b>9,2</b>	<b>11</b>	<b>8,8</b>	<b>18</b>	<b>13,9</b>	-	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<b>17</b>	<b>12,1</b>	<b>15</b>	<b>12,1</b>	<b>17</b>	<b>13,2</b>	<b>9</b>	<b>42,8</b>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<b>24</b>	<b>17,1</b>	<b>26</b>	<b>20,9</b>	<b>28</b>	<b>21,7</b>	<b>12</b>	<b>57,2</b>
<i>Staphylococcus cohnii</i>	8	5,7	31	25,0	4	3,1	-	-
<i>Staphylococcus capitis</i>	6	4,2	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus oralis</i>	<b>20</b>	<b>14,2</b>	-	-	<b>23</b>	<b>17,8</b>	-	-
<i>Streptococcus mitis</i>	4	2,8	-	-	4	3,1	-	-
<i>Candida albicans</i>	<b>10</b>	<b>7,1</b>	<b>5</b>	<b>4,1</b>	<b>9</b>	<b>6,9</b>	-	-

*Примечание* - достоверность различий между группами при ( $p < 0,001$ )

Из различного исследованного биологического материала от новорожденных выделено и идентифицировано до вида 414 штаммов, представителей различных таксонов. Наиболее обсемененным биотопом у новорожденных с ВУП являлся зев – 140 штаммов (33,8%), наименее, кровь – 21 (5,2%).

При этом общее количество положительных результатов бактериологических посевов клинического материала из очагов воспаления составил 64,8%. Чаще у детей были инфицированы зев - 61,3%, ТБА - 59,3% и ВДП - 52,4% ( $p < 0,05$ ).

Распределение положительных и отрицательных результатов представлено на Рисунке 20.

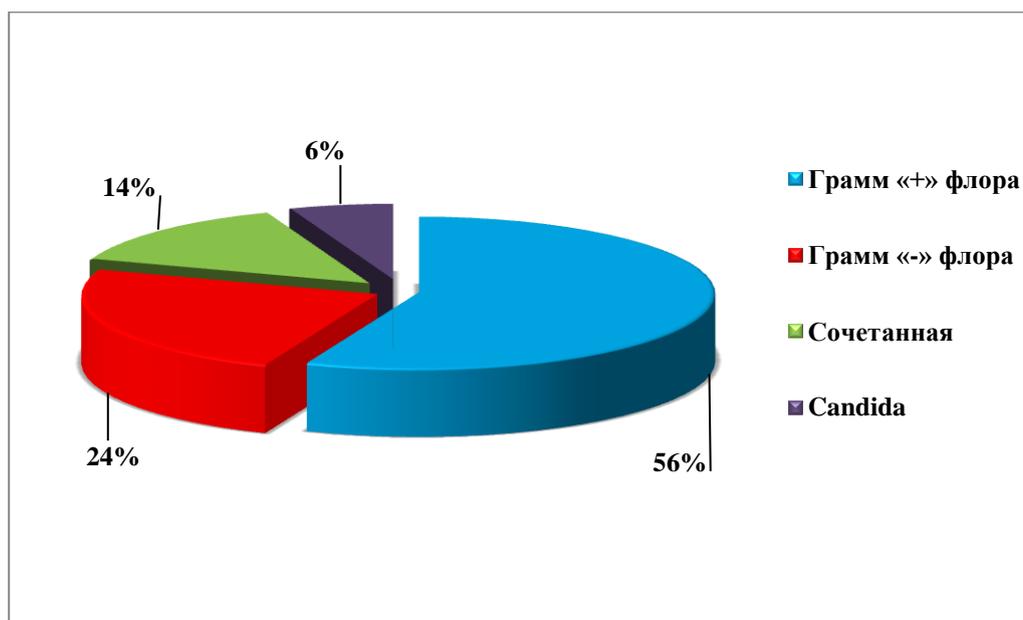


**Рис. 20 Распределение положительных и отрицательных результатов бактериологических посевов биоматериала от новорожденных с подозрением на ВУП (%)**

Из грамположительных бактерий преобладали *S. epidermidis* (21,7% от общего количества выделенных культур), *S. haemolyticus* (14%), бактерии рода *Enterococcus* составили 9,9%. Среди грамотрицательных микроорганизмов превалировали *A. baumannii* – 13,2% и *Klebsiella spp.* – 10,1%.

Грибы рода *Candida*, в основном, это были представители вида *C. albicans*, изолировали в 5,7% от всех штаммов.

На представленном Рисунке 21 достоверно чаще - 56% ( $p < 0,05$ ) высевалась грамположительная микробиота.

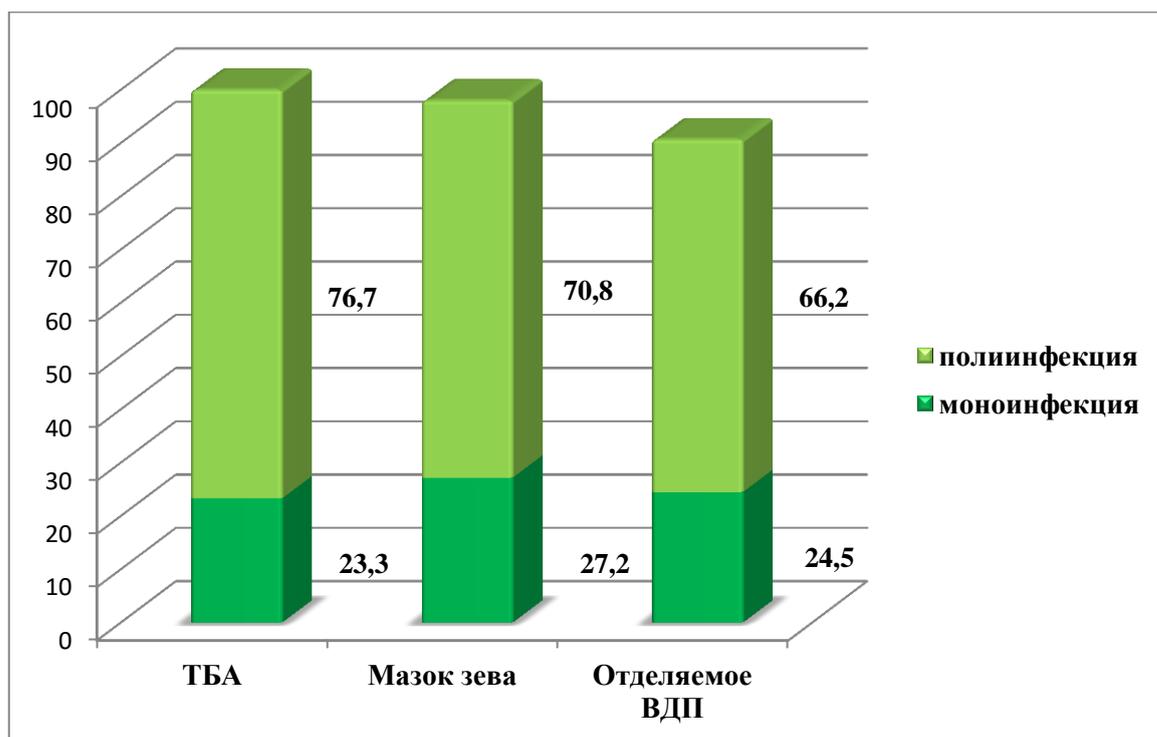


**Рис. 21 Соотношение выделенной микробиоты из различных биотопов от новорожденных ОРТН с ВУП**

Одним из этапов исследования было обследование крови новорожденных детей на стерильность. Такие анализы выполнены всем новорожденным с ВУП (230), у 12 из них была выделена гемокультура, изолировано 21 штамм, в 12 случаях - *S.epidermidis*, в 9 – *S. haemolyticus*.

Аналогичный вид микроорганизмов был обнаружен только у 3 детей в другом исследованном материале, в частности, ТБА и отделяемом зева. Отсутствие клинических признаков септического состояния, очевидно, свидетельствует, что это была кратковременная транзиторная бактериемия.

Этиологическая структура клинического материала представленная на рисунке 22 подтверждает доминирование полиинфекционной патологии ВУП над моноинфекцией ( $p < 0,05$ ).



**Рис. 22 Динамика распространения поли- и моноинфекции (%) в клиническом материале различного происхождения среди обследованных новорожденных ОРИТН родильного дома РКБ**

Необходимо отметить и дать оценку микробиоте всех исследованных биотопов.

Микробиота зева отличалась наибольшим видовым разнообразием, она была представлена 15 видами микроорганизмов (140 штаммов). Преимущественно это были грамположительные бактерии (72,1%), при этом на долю КОС приходилось 49,2% от общего числа изолятов.

Так при исследовании ТБА, мазка из зева и отделяемого из ВДП в 76%, 70,8% и в 66,2% соответственно, выявлялась микст-инфекция, тогда как моноинфекция определялась в 23,3%, 27,2% и в 24,5% случаев соответственно.

Следует отметить, что у 22,4% новорожденных в зева были выявлены двух- и трехкомпонентные ассоциации, чаще это были: *S. epidermidis*, *S. cohnii* или *C. albicans*. Их основным сочленом был *S. capitis*, но, как правило, его выделяли в более низких концентрациях. ТБА и ВДП были колонизированы в меньшей

степени, соответственно выделено 124 и 129 штаммов. И в этих случаях превалировала условно-патогенная грамположительная микробиота.

При этом у 36,4% детей из отделяемого ВДП, зева и ТБА изолировали бактерии одного и того же вида. Вновь преобладали *S. epidermidis*, *C. albicans*, а также *K. pneumoniae* и *E. faecalis*. В этой связи можно полагать, что в данных случаях имел место восходящий или аспирационный пути инфицирования, а выделенные микроорганизмы могли быть возбудителями ВУП.

Известно, что при восходящем пути инфицирования возбудителями ВУП обычно являются именно представители бактериальной микрофлоры.

Таким образом, в результате микробиологического обследования 230 новорожденных (48,3%) из различного исследуемого биологического материала были выделены микроорганизмы – представители различных таксономических групп.

Так как видовой состав изученных биотопов был представлен, по существу, только УПМ, то для определения их этиологической значимости мы также провели количественный учет изолятов из ТБА, зева, ВДП. Этиологически значимой считали концентрацию микроорганизмов, выделенных из ТБА -  $\geq 10^3$  КОЕ/мл, зева и ВДП -  $\geq 10^4$  КОЕ/мл.

Частота встречаемости микроорганизмов в исследованном биологическом материале представлена в Таблице 18.

**Результаты количественного учета микроорганизмов в различных биотопах в определенной концентрации (КОЕ/мл)**

Виды микроорганизмов	Частота встречаемости в различных биотопах в определенной концентрации (КОЕ/мл)					
	ТБА		Зев		ВДП	
	$< 10^3$	$\geq 10^3$	$< 10^4$	$\geq 10^4$	$< 10^4$	$\geq 10^4$
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	8	3	7	-	7
<i>Enterococcus faecium</i>	-	3	-	6	-	6
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	4	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<b>5</b>	<b>14</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>9,2</b>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<b>9</b>	-	<b>7</b>	-	<b>5,8</b>
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2	-	7	12	3	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<b>1</b>	<b>11</b>	<b>9</b>	<b>18,3</b>	<b>11</b>	<b>8,8</b>
<i>Staphylococcus cohnii</i>	-	1	5	9	6	5,2
<i>Staphylococcus capitis</i>	-	-	-	7,7	-	-
<i>Streptococcus oralis</i>	1	4	7	-	-	-
<i>Streptococcus mitis</i>	-	1	-	3	-	-
<i>Candida albicans</i>	3	1	6	5	-	1

*Примечание* - достоверность различий между группами при  $p < 0,05$

Из данных в таблице видно, что у 92 (63%) новорожденных из 230 обследованных, из двух и более биотопов были выделены микроорганизмы в кумуляции  $10^4 - 10^7$  КОЕ/мл. Одновременно с этим, этиологически значимыми микроорганизмами отвечающим определенным параметрам считали те из них, которые одновременно присутствовали в ТБА и в другом биотопе клинически значимых концентрациях. В ситуациях, когда выявляли условно-патогенные микроорганизмы в ТБА в микроконцентрации ( $< 10^3$  КОЕ/мл) принимали во внимание их одновременное выявление в титре  $\geq 10^4$  КОЕ/мл в двух иных биотопах.

Прежде всего, это были микроорганизмы – репрезентанты родов *Staphylococcus* и *Streptococcus*.

Почти во всех этих случаях обнаруживали параллели между высокими концентрациями одних и тех же видов бактерий в исследованных биотопах, что позволило установить их этиологическую роль в возникновении ВУП.

В процентном отношении чаще всего это выделяли *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* и *A.baumannii*. Из ТБА и зева также выделили *C. albicans* в концентрациях  $> 10^3$  и  $> 10^4$  КОЕ/мл соответственно.

Учитывая большой удельный вес грамположительной микробиоты, в частности рода *Staphylococcus spp.*, как в группе новорожденных с ВУП, так и в группе контроля, нами был проведен анализ их видовой структуры, представленный на Рисунках 23 и 24.

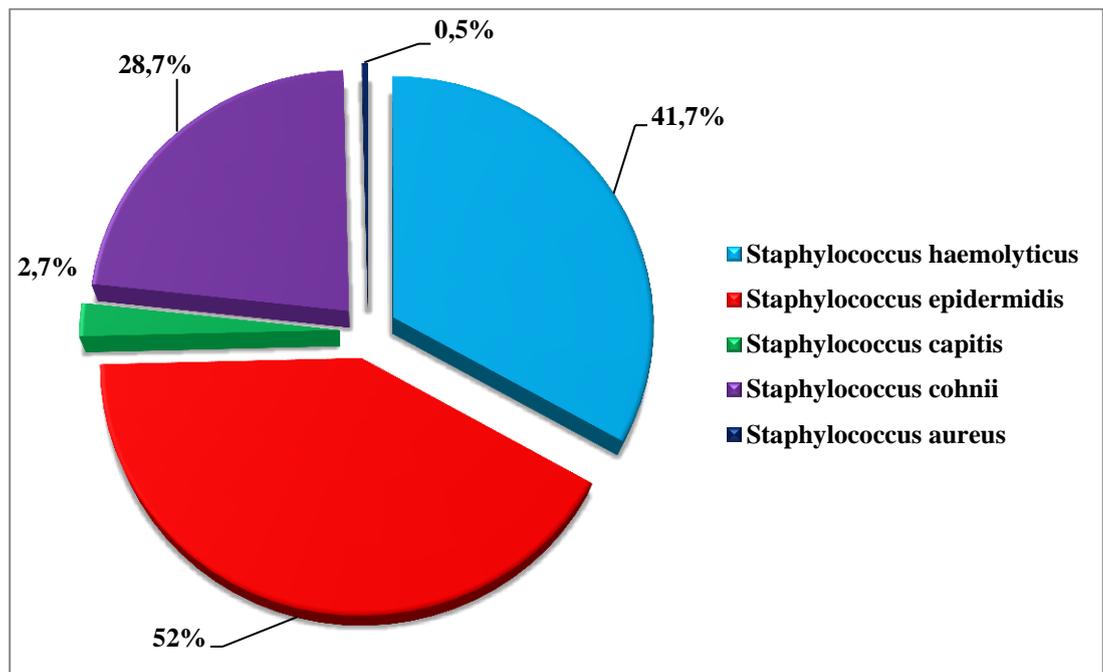


Рис.23 Частота выделения представителей рода *Staphylococcus spp.*, изолированных от новорожденных ОРИТН с ВУП

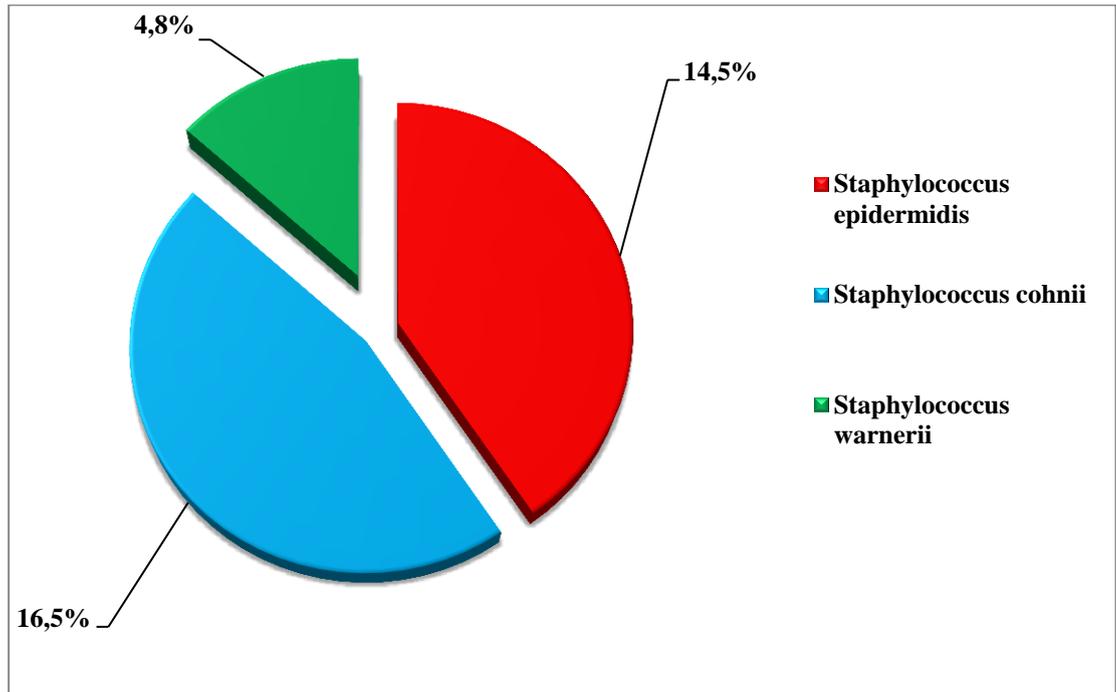


Рис. 24 Частота выделения представителей рода *Staphylococcus spp.*, изолированных от здоровых новорожденных

Статистически значимые различия в частоте выделения стафилококков в сравниваемых группах было выявлено только в отношении *S. aureus* (0,5%). Следует еще раз подчеркнуть, что эти микроорганизмы ни в одном случае не были обнаружены у детей, заболевание которых закончилось выздоровлением.

ВОЗ подчеркивает значимость определения возбудителей неонатальных пневмонии, поскольку это имеет решающее значение для назначения этиотропной терапии и проведения профилактических мероприятий [WHO, 2016], но идентификация возбудителей представляет определенные сложности [17; 83; 116].

Приобретенные нами в данной работе показатели коррелируют с литературными материалами, подтверждают важность проблемы стафилококковой обсемененности новорожденных с ВУП.

В дополнение, следует заметить, что проявление патогенности стафилококков сопряжено с использованием новейших диагностических и лечебных процедур, которые содействуют пенетрации бактерий, которыми богата микробиота человека и окружающая среда.

Учитывая полученную информацию, а также то обстоятельство, что возможность стафилококковых болезней увеличивается для новорожденных в родовспомогательных учреждениях, считается целесообразным детализированное исследование причин патогенности УПМ.

В подавляющем большинстве случаев при оценке видовой принадлежности микроорганизмов, в том числе и стафилококков, опираются не только на их биохимические свойства, но и на наличие или отсутствие у них характерных факторов патогенности. Как известно, степень патогенности зависит либо от силы действия одного, либо от совокупности влияния нескольких факторов патогенности. Гены, кодирующие детерминанты патогенности, обычно локализованы на плазмидах либо интегрированы в бактериальную хромосому в составе профагов или других генетических элементов.

Для оценки свойств ряда выделенных микроорганизмов рода *Staphylococcus*, изолированных из различных биотопов новорожденных, мы изучили некоторые факторы патогенности, в частности, наличие лецитовителлазной и ДНКазной активности, наличие гемолитических свойств.

Все выделенные штаммы стафилококков на основании изучения их свойств идентифицированы как представители коагулазоотрицательных видов стафилококков (КОС). Результаты изучения факторов патогенности выделенных КОС представлены в таблице 19.

**Характеристика факторов патогенности коагулазоотрицательных стафилококков**

Виды микроорганизмов	Кол-во штаммов	Факторы патогенности		
		Гемолизин абс.ч./%	ДНКазы абс.ч./%	Лецитовителлаза абс.ч./%
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<b>76</b>	<b>72/94,7</b>	<b>53/69,7</b>	<b>53/69,7</b>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<b>61</b>	<b>44/72,1</b>	<b>21/34,4</b>	<b>9/14,7</b>
<i>Staphylococcus cohnii</i>	<b>42</b>	<b>30/71,4</b>	<b>18/42,8</b>	<b>7/16,6</b>
<i>Staphylococcus capitis</i>	4	2/50	-	-

*Примечание* - достоверность различий между группами при  $p < 0,05$

Как видно из таблицы, выделенные штаммы стафилококков обладали определенным набором факторов патогенности. У большинства регистрировали гемолитическую активность, наличие ДНК-азы и фермента лецитовителлазы.

Выделенные культуры *Staphylococcus spp.* обладали высокой биохимической активностью, ферментировали и окисляли с выделением кислоты (без газа) глицерин, глюкозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, маннит.

Одновременное присутствие в нескольких биотопах, высокая концентрация *Staphylococcus spp.*, а также наличие ряда факторов патогенности могут свидетельствовать об этиологической значимости этих штаммов, изолированных из клинически значимых биотопов новорожденных с диагнозом ВУП.

Развитие ВУП, тяжесть, локализация и распространенность патологического процесса, а также исход возникшей патологии определяются видом возбудителя, его патогенностью и тем, какими путями микроорганизмы проникли от матери к плоду.

Доказана тесная связь развития пневмонии у новорожденных с наличием инфекционного анамнеза у матери, в том числе острых и обострений хронических заболеваний перед родами и в родах, неоднократной угрозы прерывания беременности в виде кровотечений, оперативных вмешательствах на шейке матки, длительного безводного промежутка (более 8 часов), эндометрита.

## **5.2. Микробиологическая диагностика ранних неонатальных пневмоний**

В обследованном отделении реанимации новорожденных родильного отделения ГБУ Республики Дагестан «Республиканская клиническая больница», средний показатель проведенных ИВЛ за период 2010-2015 гг. составил 91,2%. В последние годы в структуре заболеваемости стала отмечаться тенденция к увеличению пневмоний с нарастанием летальности в данной нозологической группе.

В 2010 году диагноз «ранняя неонатальная пневмония» (РНП) был выставлен в 26 (9,6%) случаях, умер 1 (3,8%) новорожденный, а в 2013 году уже 41 (16,7%) и 5 (12,1%) соответственно. Соответственно это отразилось на увеличении длительности ИВЛ в целом по отделению до  $8,7 \pm 5,4$  дней в 2010 г. и до  $9,8 \pm 6,3$  дней в 2011 г.

В результате сложившейся ситуации возникла необходимость поиска новых критериев диагностики и профилактики, разработки и осуществления комплекса мероприятий по снижению РНП у новорожденных.

В исследование были включены 246 новорожденных родильного отделения ГБУ РД «РКБ» с массой  $2700 \pm 1300$  г и гестационным возрастом  $36 \pm 4,2$  недель с различной перинатальной патологией, требующих проведение ИВЛ.

Основными причинами поступления в ОРИТН послужили необходимость наблюдения за новорожденными с заболеваниями органов дыхания, болезнями крови, эндокринной системы, неврологических состояний, повреждения головного мозга.

Поскольку обследовали новорожденных с диагнозом РНП, то более подробно остановимся на характеристике микробиоты ТБА и мазков задней стенки глотки новорожденных ОРИТН родильного дома ГБУ «РКБ».

Микробиота мазков задней стенки глотки отличалась наибольшим видовым разнообразием, она была представлена 17 видами микроорганизмов (40 штаммов). Преимущественно это были грамотрицательные бактерии (77,5%), при этом они представлены многочисленными родами семейства *Enterobacteriaceae* (клебсиеллы, эшерихии, протеи, энтеробактеры, цитробактеры, серрации и др.).

Актуальные методы лабораторной диагностики РНП, регламентируемые рабочими методологическими инструкциями, предполагают многоэтапный процесс, в связи с разнообразием похожих биохимических реакций и яркой выраженностью родственных уз представителей УПМ.

Выделены две группы – новорожденные с РНП (246) и контрольная группа сравнения - здоровых новорожденных (103). Обе группы новорожденных значительно отличались по стратегии и тактике интенсивной терапии. В отличие от детей группы сравнения, новорожденные с РНП статистически значимо чаще получали вазоактивные лекарственные препараты ( $p = 0,009$ ), нуждались в экстренной реинтубации ( $p = 0,02$ ), а также получали питание через постпилорический зонд ( $p < 0,001$ ).

Новорожденные с РНП статистически значимо дольше нуждались в ИВЛ, в лечении как в условиях ОРИТН, так и в целом в условиях стационара ( $p < 0,001$ ).

Видовой состав возбудителей РНП у новорожденных ОРИТН ГБУ РД «РКБ» определяли на основании бактериологического исследования. Поскольку видовой состав исследованных локусов был репрезентирован собственно лишь УПМ, то для определения их этиологической ценности мы провели еще и количественный учет изолятов из ТБА, слизистой задней стенки глотки и ВДП.

При этом руководствовались итогами скрининга новорожденных группы сравнения, равно как и то, что микробиологическое обследование проводили через 48-72 часа жизни малыша.

Отсюда следует, что этиологически значимой концентрацией микроорганизмов считали титр  $10^4$  КОЕ/мл и выше для ТБА и  $10^6$  КОЕ/т и выше для мазка со слизистой задней стенки глотки и ВДП.

У всех обследованных детей из различных биотопов были изолированы различные микроорганизмы условно-патогенной микробиоты.

Состав микробиоты и частота ее выделения представлены на Рисунке 25.

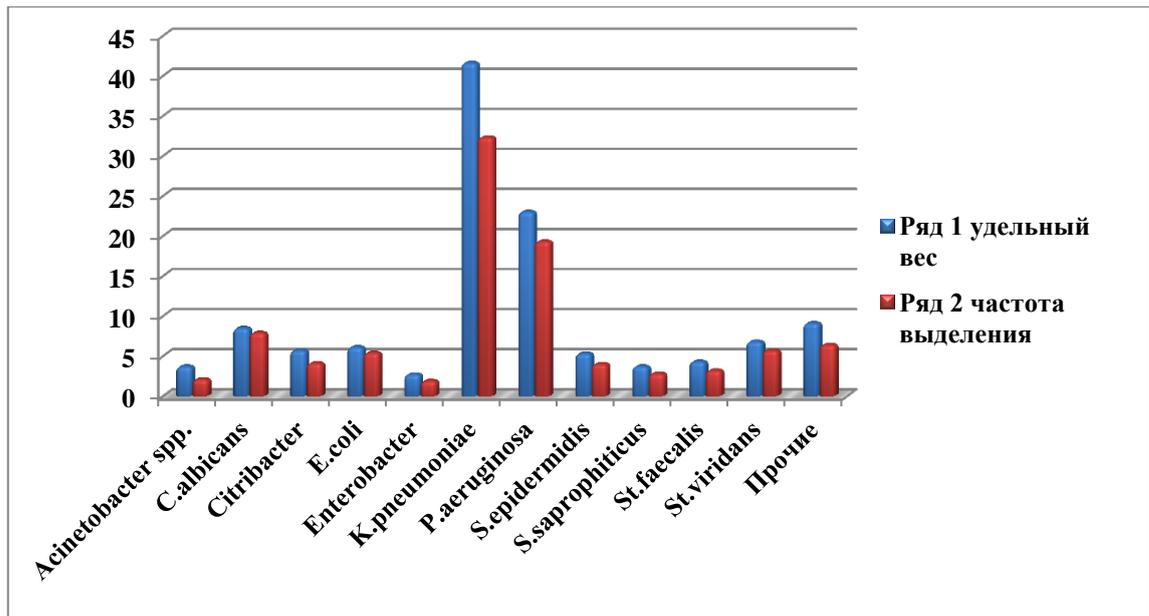


Рис. 25 Видовой состав микробиоты и частота выделения микроорганизмов из ТБА новорожденных ОРИТН родильного дома за период с 2010 по 2015 гг.

Очевидно из представленной диаграммы, негативные итоги в посевах из ТБА, были зафиксированы у трети исследуемых.

При первичном обследовании большинство из них составили грамотрицательные микроорганизмы (58,6%), среди них в 44,3% - энтеробактерии, такие, как, *E.coli*, *Enterobacter aerogenes*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* и другие, в 19,1% - *P.aeruginosa*, а также в 1,4% *H.influenza* и 0,8% *Moraxella spp.* Грамположительные микроорганизмы были обнаружены в 27,9%, это: *S.epidermidis*, *S.aureus*, *Enterococcus spp.*, *Streptococcus spp.* и другие. Изредко в этиологически значимом количестве фиксировали рост грибов, в частности *Candida albicans* (4 %). В позитивных посевах доминантным



<i>influenzae</i>	5	4,3	2	1,7	-	-	-	-
<i>Moraxella spp.</i>	3	2,6	-	-	2	1,4	-	-

*Примечание* - достоверность различий между группами при ( $p < 0,05$ )

Как видно из представленных данных, среди выделенных микроорганизмов по частоте на первом месте - *K. pneumoniae* (19,7%), на втором - *E.coli* (17,1 %) на третьем - *S.epidermidis* (15,5 %) и далее *P. aeruginosa* (11%).

Анализ полученных результатов показал, что у 106 (43%) новорожденных была выявлена моноинфекция.

Так, у 31 (29,2%) новорожденного выделяли *K. pneumoniae*, у 24 (22,6%) - *E.coli*, у 19 (17,9%) - *S.epidermidis*, у 12 (11,3%) новорожденных - *P.aeruginosa*, от 9 (8,4%) – *Serratia marcescens*, у 7 (6,6%) - *Enterococcus faecalis* и у 4 (3,7%) новорожденных - *Enterobacter aerogenes* и *Citrobacter spp.*

Ассоциации 2-х и более микроорганизмов встречались у 140 (57%) обследованных детей, это были сочетания представителей семейства *Enterobacteriaceae* с грамположительными кокками (18%), или с псевдомонадами (23%), а также микст инфекция грамположительных кокков с псевдомонадами (7%). Ассоциации грамположительных кокков с другими грамотрицательными микроорганизмами встречались у 2 % новорожденных. У 7 % новорожденных наблюдалось сочетание бактерий с грибами. Ассоциации выделенных микроорганизмов представлены в Таблице 21.

**Ассоциации выделенных микроорганизмов - возбудителей РНП у новорожденных**

Возбудители РНП и их сочетания	абс. ч n=140	%
<i>E.coli, S.epidermidis, E.coli, Enterococcus spp.</i>	<b>16</b>	<b>11,4</b>
<i>E.coli, Streptococcus spp.</i>	<b>12</b>	<b>8,5</b>
<i>E.coli, K.pneumoniae, Enterococcus spp.</i>	<b>12</b>	<b>8,5</b>
<i>Acinetobacter baumannii, K.pneumoniae</i>	<b>13</b>	<b>9,2</b>
<i>Acinetobacter baumannii, Enterococcus spp.</i>	8	5,7
<i>K.pneumoniae, Enterococcus spp.</i>	6	4,2
<i>K.pneumoniae, H.influenzae</i>	8	5,7
<i>K.pneumoniae, S.epidermidis</i>	<b>17</b>	<b>12,1</b>
<i>K.pneumoniae, Enterococcus spp., P.aeruginosa</i>	4	2,8
<i>K.pneumoniae, Ser.marcescens, P.aeruginosa</i>	6	4,2
<i>K.pneumoniae, Ps.aeruginosa</i>	9	6,4
<i>E.coli, P.aeruginosa</i>	5	3,5
<i>P.aeruginosa, S.epidermidis</i>	8	5,7
<i>P.aeruginosa, Enterococcus spp.</i>	6	4,2
<i>K.pneumoniae, E.coli, Acinetobacter spp.</i>	3	2,1
<i>K.pneumoniae, Enterobacter spp.</i>	7	5

*Примечание* - достоверность различий между группами при ( $p < 0,05$ )

У 18,2% детей в зева были выявлены двухкомпонентные ассоциации. Слизистые ВДП и ТБА были колонизированы в большей степени, соответственно выделено 32 и 45 штаммов. И в этих случаях превалировала условно-патогенная грамотрицательная микрофлора.

Следует подчеркнуть, что у 60 % детей минимум из 2 биотопов были выделены представители одних и тех же видов микроорганизмов, чаще это были: *S. epidermidis*, *S. cohnii* и *C. albicans*. При этом у 38,2% детей из отделяемого ВДП,

зева и ТБА изолировали бактерии одного и того же вида. Вновь преобладали *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, а также *S. epidermidis* и *C. albicans*.

В связи с этим можно предположить, что в данных случаях имел место восходящий или аспирационный пути инфицирования, а выделенные микроорганизмы могли быть возбудителями РНП.

Следует отметить, что, по данным микробиологического анализа, РНП обусловленные бактериальными ассоциациями, обычно отличались более тяжелым клиническим течением и более распространенным поражением легких. Они характеризовались двусторонним поражением легких, были тотальными или субтотальными (66,7%)

Из 246 новорожденных у 89 в возрасте от 0 до 6 дней жизни параллельно исследованию ТБА и слизистой ВДП проводилось бактериологическое исследование крови на двухфазной питательной среде для определения гемокультур. Данные анализа представлены в Таблице 22.

Таблица 22

**Высеваемость гемокультуры от новорожденных с подозрением на сепсис (n=89)**

5 мл крови из пупочной вены, соотношение крови и среды 1:10	Высеваемость, (абс.ч)	%
количество положительных находок	39	43,8
<i>K. pneumoniae</i>	12	30,7
<i>S. epidermidis</i>	8	20,5
<i>P. aeruginosa</i>	8	20,5
<i>Candida albicans</i>	7	17,9
ассоциации микроорганизмов:		
<i>K. pneumoniae</i> + <i>S. epidermidis</i>	2	5,1
<i>P. aeruginosa</i> + <i>Candida albicans</i>	2	5,1

*Примечание* - достоверность различий между группами при ( $p < 0,05$ )

Как видно из представленных данных, только у 39 (43,8%) новорожденных были обнаружены в посевах микроорганизмы: *S. epidermidis* (34,2%), *K.pneumoniae* (22,8%), *P. aeruginosa* (22,8%), *Candida spp.* (20%).

У 4 новорожденных отмечались сочетания 2 микроорганизмов. Это были ассоциации *K.pneumoniae* и *S. epidermidis* у 2 новорожденных и *P.aeruginosa* с *C. albicans* также у 2 новорожденных. Однако только у 5 детей было совпадение бактериальных возбудителей в ТБА и крови, что составляло 26%.

В проведенном в динамике заболевания бактериологическом исследовании было установлено, что из 93 (37,8%) новорожденных у 32 (34,5%) детей происходила смена возбудителя, когда через  $6\pm 1$  день после первичного обследования выделялся в этиологически значимом количестве другой микроорганизм, что сопровождалось ухудшением клинического течения заболевания. При этом наиболее часто выделялись: *K.pneumoniae*, *S. epidermidis* и *P.aeruginosa*.

Как известно, патогенное действие на организм человека УПЭ проявляют при прохождении патогенов через барьерные ткани, в том числе через слизистые оболочки во внутреннюю среду в больших объемах, и еще, при резком снижении общего и местного иммунитета. При исследовании биологических свойств выделенных штаммов микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* было выявлено, что все они обладали определенным набором факторов патогенности.

К основным факторам патогенности (вирулентности) считают умение микроорганизмов адгезироваться, и колонизироваться, резистентность к бицидным факторам макроорганизма, свойства инвазивности и токсигенности [62].

Первичная идентификация с использованием комбинированных сред допускает квалифицировать только 4-5 культуральных признака, на основании коих однозначное решение о причислении культуры к конкретному роду не представляется возможным.

Для идентификации микроорганизмов - возбудителей ранних неонатальных пневмоний, кроме морфологических и культурных свойств, необходимо изучение

биохимических признаков. Несомненно, спектр биохимических показателей является в достаточной мере надежным признаком.

В работе определяли сахаролитические, протеолитические свойства бактерий, пигменто- и токсинообразование.

Постановкой реакции гемагглютинации проводили исследование адгезивной активности УПЭ с эритроцитами человека. Посредством электронной микроскопии было выявлено, что клетки штаммов *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli* обладают высокой адгезивной активностью и в большинстве случаев плотно прилегают к эритроцитам.

Гемолитическую активность микроорганизмов изучали на чашках Петри с сухим питательным агаром и добавлением эритроцитарной массы. Выделенные штаммы микроорганизмов, выделенные от новорожденных с РНП обладали адгезивной и гемолитической активностью. Выделенные штаммы проявляли гемолитическую, желатиназную, уреазную активность. Штаммы *E. coli* продуцировали ДНК-азу, вырабатывали гемотоксин (на кровяном 5% агаре), лецитиназу.

Штаммы *P. aeruginosa* обладали выраженной гемолитической, гиалуронидазной, эластазной и фосфолипазной активностью (на ЦПХ-агаре). Выделенные штаммы микроорганизмов проявляли высокую ферментативную активность. Спектр биологических свойств представлен в Таблице 23.

**Спектр биологических свойств, присущих бактериям семейства  
*Enterobacteriaceae*, выделенных от новорожденных**

Микроорганизм \ Признак	<i>K. pneumoniae</i> 75/30,4%	<i>P. aeruginosa</i> 42/17,1%	<i>E. coli</i> 65/26,4%
Скорость размножения	Обычная	Обычная	Обычная
Расщепление углеводов	Средняя ферментативная активность	Чаще проявляется	Высокая ферментативная активность
Гемолитическая активность	Выражена	Чаще проявляется	Чаще проявляется
Лецитиназная активность	Выражена	Чаще проявляется	Выражена
ДНК-азная активность	Выражена	Чаще проявляется	Выражена
Продукция энтеротоксин	+	+	+

Полученные результаты свидетельствуют о роли выделенных штаммов микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* в этиологии РНП новорожденных ОРИТН родильного дома ГБУ «РКБ».

Следующий этап нашего исследования мы посвятили изучению факторов патогенности доминирующего возбудителя неонатальных пневмоний - *Klebsiella pneumoniae* на молекулярно-генетическом уровне.

### 5.2.1. Изучение факторов патогенности *Klebsiella pneumoniae* на молекулярно-генетическом уровне

В последнее время ученые проявляют интерес к условно-патогенным энтеробактериям рода *Klebsiella spp.*, поскольку, являются владельцами экологической и биологической гибкости, и не исключено, что они в состоянии приобретать возможность длительного присутствия в макроорганизме и оказываться поводом для развития различных заболеваний [154]. В качестве

одной из причин этого феномена рассматривают изменение патогенности этих микроорганизмов [75]. Известно, что изменение патогенности у бактерий осуществляется на генетическом уровне посредством мутаций и генетических рекомбинаций [154].

Преимущественно значительными для трансформации патогенности УПЭ, ввиду тенденции к «скачкообразности» и значимости осуществляемых преобразований микроорганизма, рассматривают генетические рекомбинации, которые определяют геномную пластичность *Enterobacteriaceae*, воплощённую через некоторые конкретные механизмы, аффилированные, в частности, с «островами» и «островками» патогенности [75]. По литературе известно, по меньшей мере, 78 серотипов (К антиген, капсульный) для *K. pneumoniae*. Несколько серотипов (включая преобладающие K<sub>1</sub> и K<sub>2</sub>) обладают уникальным гиперслизистым (гипервирулентным) фенотипом вследствие повышенной продукции капсульного полисахарида (КПС), который считается главным фактором вирулентности *K. pneumoniae* и определяются по наличию гиперслизистых колоний на чашке Петри. Степень слизистости положительно коррелирует с инвазивностью инфекционного агента. Однако связь гипервирулентных штаммов с гиперпродукцией капсулы остается под вопросом, поскольку повышенное содержание полисахаридов может быть следствием включения полисахаридов из внешней среды, а не полисахаридов «истинного происхождения».

Гипервирулентные штаммы *K. pneumoniae* являются высоко инвазивными и могут поражать даже здоровых индивидов, приводя к развитию внутрибольничных жизнеугрожающих инфекций, таких как пиогенный абсцесс печени, менингит, некротизирующий фасциит, эндофтальмит и тяжелая пневмония. В частности, K<sub>1</sub>/K<sub>2</sub>-вызванный абсцесс печени часто осложняется метастатическим распространением инфекции. Эта особенность является характерной для гиперслизистых штаммов *K. pneumoniae* и не присуща другим грамотрицательным бактериям.

В наших исследованиях был проведен анализ на наличие у *K. pneumoniae* ряда генетических показателей: *allS* (activator of the allantoin regulon gene), *rmpA* (Capsular polysaccharide biosynthesis gene), *cf29a* (Adhesion associated gene), *Uge* (Uridine diphosphate galacturonate 4-epimerase gene) и *wabG* (Core LPS biosynthesis gene), белковые продукты которых отвечают за адгезию и за синтетические процессы (синтез капсульного полисахарида (КПС) и биосинтез ЛПС). Последовательности праймеров представлены ниже: *allS\_f* - 5'- CCG TTA GGC AAT CCA GAC -3'; *allS\_r5'*- TCT GAT TTA ACC CAC ATT -3' *rmpA\_f5'*- ACT GGG CTA CCT CTG CTT CA -3' *rmpA\_r5'*- CTT GCA TGA GCC ATC TTT CA -3' *cf29a\_f5'*- GAC TCT GAT TGC ACT GGC TGT G -3' *cf29a\_r5'*- GTT ATA AGT TAC TGC CAC GTT C -3' *uge\_f5'*- GAT CAT CCG GTC TCC CTG TA -3' *uge\_r5'*- TCT TCA CGC CTT CCT TCA CT -3' *wabG\_f5'*- CGG ACT GGC AGA TCC ATA TC -3' *wabG\_r5'*- ACC ATC GGC CAT TTG ATA GA -3'. В наших исследованиях было показано, что у нескольких изолятов, полученных от новорожденных с пневмонией выявлялись данные генетические маркеры.

КПС *K. pneumoniae* является кислотным полисахаридом, который состоит в основном из 3-6 повторяющихся углеводов. КПС синтезируется по Wzy-зависимому пути полимеризации, который хорошо описан для КПС 1 группы *E. coli*; кластеры гена *crs* состоят из генов, ответственных за синтез полисахаридов, повторяющихся участков капсулы, их сбора и экспорта. Общая длина гена *crs* составляет от 21 до 30 kb, и содержит 16-25 генов. В области 5'-конца находится кластер 6 консервативных генов (*galF*, *orf2*, *wzi*, *wza*, *wzb* and *wzc*), в области 3'-конца - консервативные гены *gnd* и *ugd*. В центральной области находятся высоко дивергентные гены, которые кодируют белки для полимеризации и сборки КПС. Гены *wzi* и *wzy* представлены у всех К типов, которые, однако, имеют переменные последовательности у разных К типов. Следовательно, с помощью *wzy*-направленного ПЦР анализа можно идентифицировать К<sub>1</sub>, К<sub>2</sub>, К<sub>3</sub>, К<sub>5</sub>, К<sub>20</sub>, К<sub>54</sub>, К<sub>57</sub> и, более того, с помощью секвенирования *wzi* можно определить К тип большинства клинических штаммов *K. pneumoniae*. Данный метод был использован для обнаружения новых капсульных типов *K. pneumoniae*.

Синтез КПС начинается со сбора отдельных единиц, состоящих из углеводных повторов, которые подвергаются действию различных гликозилтрансфераз. Образующиеся фрагменты транспортируются через внутреннюю мембрану при помощи флиппазы Wzx и полимеризуются под действием фермента Wzx полимеразы в околоплазменном пространстве. Дальнейшая полимеризация и экспорт сформированного КПС на поверхность бактериальной клетки происходит за счет совместного действия Wza (тирозин аутокиназа внутренней мембраны), Wzb (протеин-тирозин фосфатаза), Wzc (интегральный липопротеин наружной мембраны). Ген *magA* (*wzyKpK1*) кодирует капсульную K<sub>1</sub>-специфическую Wzy полимеразу, не влияет на синтез ЛПС и был описан в экспериментально K<sub>1</sub>-индуцированной метастатической инфекции, как важный фактор вирулентности *K. pneumoniae*.

Ген *gmpA* и его изоформа *gmpA2* имеют плазмидное происхождение и кодируют белки, активирующие транскрипцию гена *cps*, отвечающие за синтез КПС и гиперслизистость K<sub>1</sub>/K<sub>2</sub> *K. pneumoniae*. У K<sub>2</sub> штамма CG43 оба, *gmpA* и *gmpA2*, участвуют в активации синтеза КПС и оказывают сильное влияние на вирулентность у мышей. У K<sub>1</sub> штамма NTUH-K2044 помимо плазмидных генов *gmpA* и *gmpA2* имеется также паралог *gmpA* на хромосоме, однако только плазмидные *gmpA* способны повышать транскрипцию гена *cps*.

Учитывая, что ряд возбудителей *K. pneumoniae*, полученных от пациентов с неонатальной пневмонией, содержал генетические маркеры, продукты которых относятся к факторам патогенности возбудителя. А также, что по данным литературы известно, что капсула на поверхности *K. pneumoniae* защищает бактерию от опсонизации и фагоцитоза макрофагами, другие факторы клебсиелл участвуют в подавлении воспалительных реакций, а также возбудитель может быть резистентен к противомикробным пептидам, в дальнейших главах диссертации представлен материал о влиянии *K. pneumoniae* на экспрессионный профиль генов, белковые продукты которых участвуют во врожденном иммунитете.

### 5.3. Сравнительный анализ результатов микробиологического исследования внутриутробных и ранних неонатальных пневмоний

Для определения эффективности проведенных исследований, мы провели сравнительный анализ результатов бактериологической диагностики НП.

При бактериологическом исследовании в целом в обеих группах наблюдения отмечался рост как грамположительной, так и грамотрицательной микрофлоры. Данные представлены на Рисунке 26.

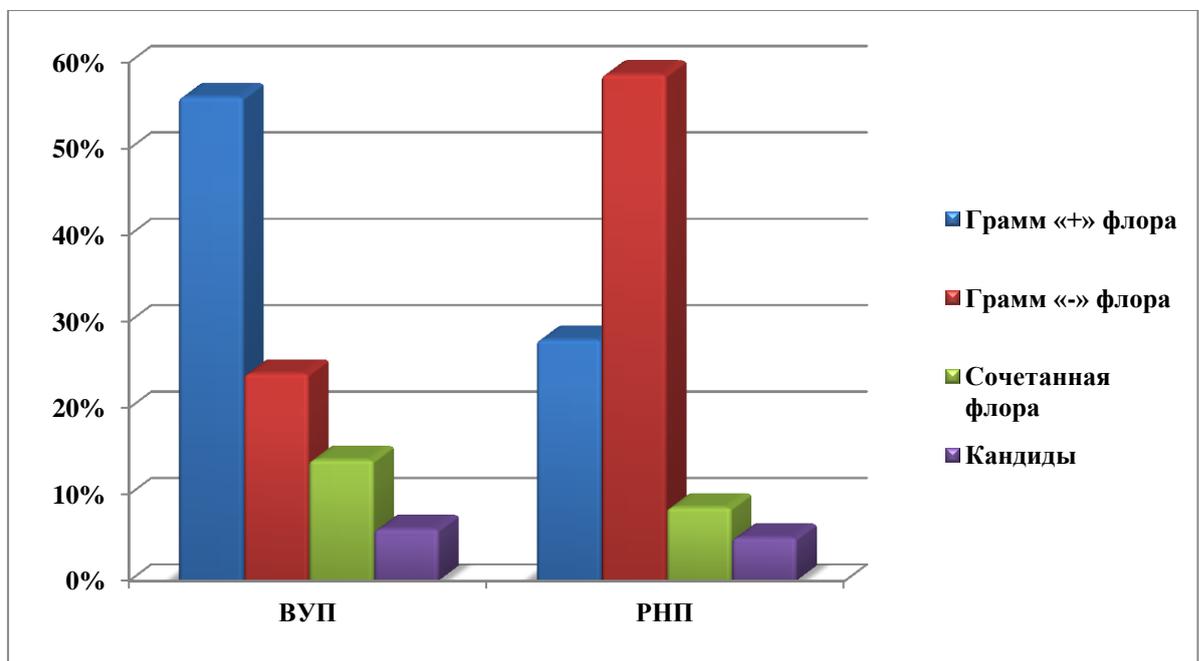


Рис. 26 Соотношение выделенной микрофлоры из различных биотопов от новорожденных с ВУП и РНП

Как видно из рисунка, грамположительные микроорганизмы достоверно чаще ( $p < 0,05$ ) высеивались при внутриутробных пневмониях (56%). А грамотрицательная микрофлора с высокой степенью достоверности ( $p < 0,001$ ) чаще отмечалась при ранних неонатальных пневмониях (58,6%). В группе внутриутробных пневмоний отмечались ассоциации грамположительной и грамотрицательной микрофлоры в равных соотношениях, а в группе ранних неонатальных – преобладали грамотрицательные микробные ассоциации.

Практически идентичны данным бактериологического исследования результаты ПЦР.

Из 230 обследованных новорожденных с ВУП родильного отделения ГБУ РД «РКБ» у 213 (87,5%) бактериологический посев был положительным. Доминирующим микроорганизмом являлся *S. epidermidis*. У 246 обследованных новорожденных с РНП было выделено и идентифицировано 348 штаммов в этиологически значимом количестве. Как видно из данных представленных в таблице, среди выделенных микроорганизмов по частоте выделения на первом месте - *K. pneumoniae* (19,7%), на втором - *E.coli* (17,1 %) на третьем - *S.epidermidis* (15,5 %) и далее *P. aeruginosa* (11%). Данные исследования представлены в Таблице 24.

Таблица 24

**Сравнительная оценка этиологической структуры ВУП и РНП ОРНТН родильного дома ГБУ РД «Республиканская клиническая больница» (%)**

Виды микроорганизмов	Исследованный материал							
	мазок из зева		отделяемое ВДП		ТБА		кровь	
	ВУП	РНП	ВУП	РНП	ВУП	РНП	ВУП	РНП
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9,2	25,2	8,8	6,7	13,9	27,5	-	-
<i>Escherichia coli</i>	2,8	16,5	-	17,5	-	18,1	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	11,4	1,7	20,9	2,5	10,1	2,2	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	4,3	-	5	-	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	3,5	-	2,5	-	2,2	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	2,8	-	-	-	-	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	1,7	-	1,7	-	2,2	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	8,7	-	11,6	-	13	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	17,1	10,4	20,9	14,2	21,7	16,6	57,2	87,5

<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	12,1	-	12,1	-	13,2	-	42,8	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-	8,7	-	20,8	-	8	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	1,7	-	1,7	-	1,4	-	12,5
<i>Staphylococcus cohnii</i>	5,7	-	25,0	-	3,1	-	-	-
<i>Staphylococcus capitis</i>	4,2	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	8,7	8,1	10	10,1	7,2	-	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	4,3	-	1,7	-	-	-	-
<i>Moraxella spp.</i>	-	2,6	-	-	-	1,4	-	-
<i>Candida albicans</i>	7,1	-	4,1	-	6,9	-	-	-

Примечание - достоверность различий между группами при ( $p < 0,01$ )

Учитывая приведенные данные, а также тот факт, что вероятность возникновения инфекционных осложнений при неонатальных пневмониях возрастает для новорожденных в родильных домах, представляется целесообразным подробное изучение факторов патогенности УПМ.

В подавляющем большинстве случаев при оценке видовой принадлежности микроорганизмов, в том числе и стафилококков, опираются не только на их биохимические свойства, но и на наличие или отсутствие у них характерных факторов патогенности.

Для оценки свойств ряда выделенных микроорганизмов рода *Staphylococcus*, изолированных из различных биотопов новорожденных, мы изучили некоторые факторы патогенности, в частности, наличие лецитовителлазной и ДНКазной активности, наличие гемолитических свойств.

Все выделенные штаммы стафилококков на основании изучения их свойств идентифицированы как представители коагулазаотрицательных видов стафилококков (КОС). Результаты изучения факторов патогенности выделенных КОС представлены в Таблице 25.

**Характеристика факторов патогенности КОС выделенных от новорожденных ОРПН родильного дома ГБУ РД «РКБ»**

Виды микроорганизмов	Кол-во штаммов	Факторы патогенности		
		Гемолизин абс.ч./%	ДНКаза абс.ч./%	Лецитовителлаза абс.ч./%
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<b>76</b>	<b>72/94,7</b>	<b>53/69,7</b>	<b>53/69,7</b>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<b>61</b>	<b>44/72,1</b>	<b>21/34,4</b>	<b>9/14,7</b>
<i>Staphylococcus cohnii</i>	<b>42</b>	<b>30/71,4</b>	<b>18/42,8</b>	<b>7/16,6</b>
<i>Staphylococcus capitis</i>	4	2/50	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	<b>75</b>	<b>71/94,6</b>	<b>62/82,6</b>	<b>42/56</b>
<i>P. aeruginosa</i>	<b>42</b>	<b>37/88,1</b>	<b>36/85,7</b>	<b>24/57,1</b>
<i>E. coli</i>	<b>65</b>	<b>53/81,5</b>	<b>42/64,6</b>	<b>42/64,6</b>

*Примечание* - достоверность различий между группами при  $p < 0,05$

Полученные результаты свидетельствуют о роли выделенных штаммов микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* в этиологии РНП новорожденных родильного отделения ГБУ Республики Дагестан "Республиканская клиническая больница".

Как видно из таблицы, выделенные штаммы микроорганизмов обладали определенным набором факторов патогенности. У большинства регистрировали гемолитическую активность, наличие ДНК-азы и фермента лецитовителлазы.

Выделенные культуры *Staphylococcus spp.* обладали высокой биохимической активностью, ферментировали и окисляли с выделением кислоты (без газа) глицерин, глюкозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, маннит.

При исследовании биологических свойств выделенных штаммов микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* было выявлено, что все они обладали определенным набором факторов патогенности.

Данные микробиологического исследования новорожденных выявили существенные изменения этиологической структуры неонатальных пневмоний в последние годы.

На основании вышеизложенного, следует констатировать, что при неонатальных пневмониях в этиологической структуре выявляется как грамположительная, так и грамотрицательная микробиота. Однако достоверно чаще грамположительная отмечается при внутриутробных пневмониях ( $p < 0,001$ ). А при ранних приобретенных пневмониях с высокой степенью достоверности преобладает грамотрицательная флора ( $p < 0,001$ ). Имеются значимые различия и в штаммах исследованных микробов. При внутриутробных пневмониях высевается чаще *S. epidermidis*, а при ранних неонатальных – *K.pneumoniae*.

В эпидемиологическом надзоре за состоянием инфекционно-воспалительной заболеваемости большое значение имеет мониторинг за селекцией и распространением антибиотикорезистентных штаммов.

По существу, не менее значимой задачей, является накопление информации о региональных особенностях антибиотикорезистентности возбудителей неонатальных пневмоний.

В связи с этим, представлялось целесообразным изучение антибиотикорезистентности различных видов микроорганизмов, выделенных от новорожденных родильного отделения ГБУ РД «РКБ» с диагнозом пневмония.

## ГЛАВА 6. АНАЛИЗ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ НЕОНАТАЛЬНЫХ ПНЕВМОНИЙ

По результатам полученных и представленных в предыдущих разделах данных наиболее частой причиной неонатальных пневмоний являются бактерии (90%); вирусы и грибы встречаются значительно реже. Этиология неонатальных пневмоний за последнее десятилетие претерпела значительные изменения; это является следствием использования новых антибактериальных препаратов широкого спектра действия, а также - появления мультирезистентных штаммов в окружающей среде и увеличения количества инвазивных процедур [69].

К снижению роли стафилококков в этиологии пневмоний и одновременному значительному росту числа инфекций, вызванных грамотрицательными возбудителями, привело внедрение в клиническую практику пенициллинастабильных бета-лактамных антибиотиков.

Нерациональная эмпирическая антибактериальная терапия (АБТ) пневмонии у новорожденного увеличивает риск осложнений и летального исхода в 1,5 раза, что еще раз убеждает в целесообразности проведения адекватной этиотропной АБТ, базирующейся на региональных данных о структуре и чувствительности циркулирующих в родовспомогательных учреждениях возбудителей. Под принципом адекватности рассматривается соответствие спектра активности препарата этиопатогену [161].

Изменение этиологической структуры пневмонии, как и других инфекционно-воспалительных заболеваний (ИВЗ) у новорожденных, отражает процесс изменения микроэкологии у беременных, медицинского персонала, окружающей среды, определяется набором и свойствами антибактериальных препаратов, широтой использования антибиотиков новых поколений [161].

Как известно, успех лечения новорожденных зависит от того, насколько адекватно подобрана этиотропная терапия, что, в свою очередь, тесно связано с проведением бактериологического мониторинга [27; 69].

В связи с чем, выбор антибактериальных препаратов (АБП) должен соответствовать современным знаниям о наиболее вероятных возбудителях инфекционных заболеваний новорожденных, спектре активности антибиотиков профилю резистентности микроорганизмов в регионе и в каждом учреждении здравоохранения [161].

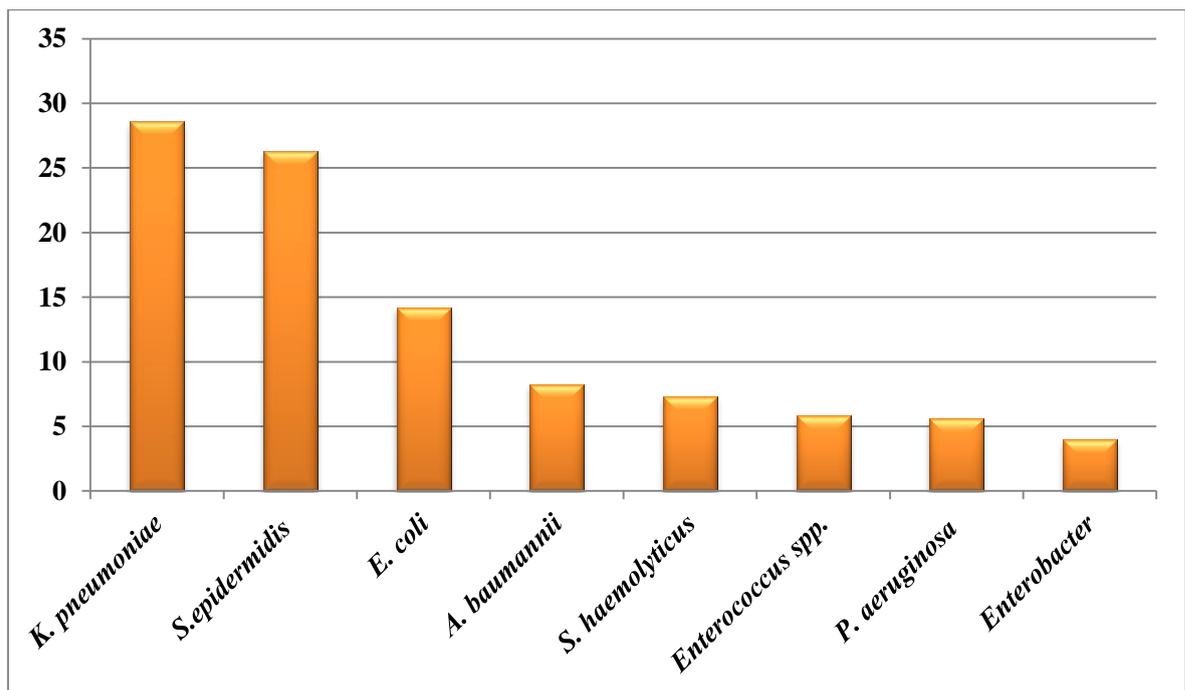
Тяжесть состояния пациентов обуславливает почти 10-кратное увеличение потребления антибактериальных препаратов в ОРИТ по сравнению с обычными отделениями стационара [27]. Антибактериальную терапию обычно получают более 60% пациентов ОРИТ, при этом наиболее часто используются антибиотики широкого спектра действия или комбинации нескольких АБП (у половины пациентов) [69]. Интенсивное использование препаратов широкого спектра действия способствует появлению и распространению резистентности к АБП среди возбудителей [161].

Современные принципы лечения жизнеугрожающих инфекций подразумевают незамедлительное назначение АБП сразу же после установления инфекции, причем для стартовой терапии следует применять монотерапию или комбинацию АБП, активных в отношении всех наиболее вероятных возбудителей с учетом возможной антибиотикорезистентности [161].

В последние годы в структуре заболеваемости отделения реанимации и интенсивной терапии родильного дома РКБ г. Махачкалы стала отмечаться тенденция к увеличению пневмоний с нарастанием летальности в данной нозологической группе. Так в 2014 году диагноз «Пневмония» был выставлен в 26 (9,6%) случаях, умер 1 (3,8%) новорожденный, а в 2015 году уже 41 (16,7%) и 5 (12,1%) соответственно.

В связи вышеизложенным и с целью накопления информации о региональных особенностях антибиотикорезистентности возбудителей неонатальных пневмоний к антимикробным препаратам крайне важной задачей является проведение локального мониторинга.

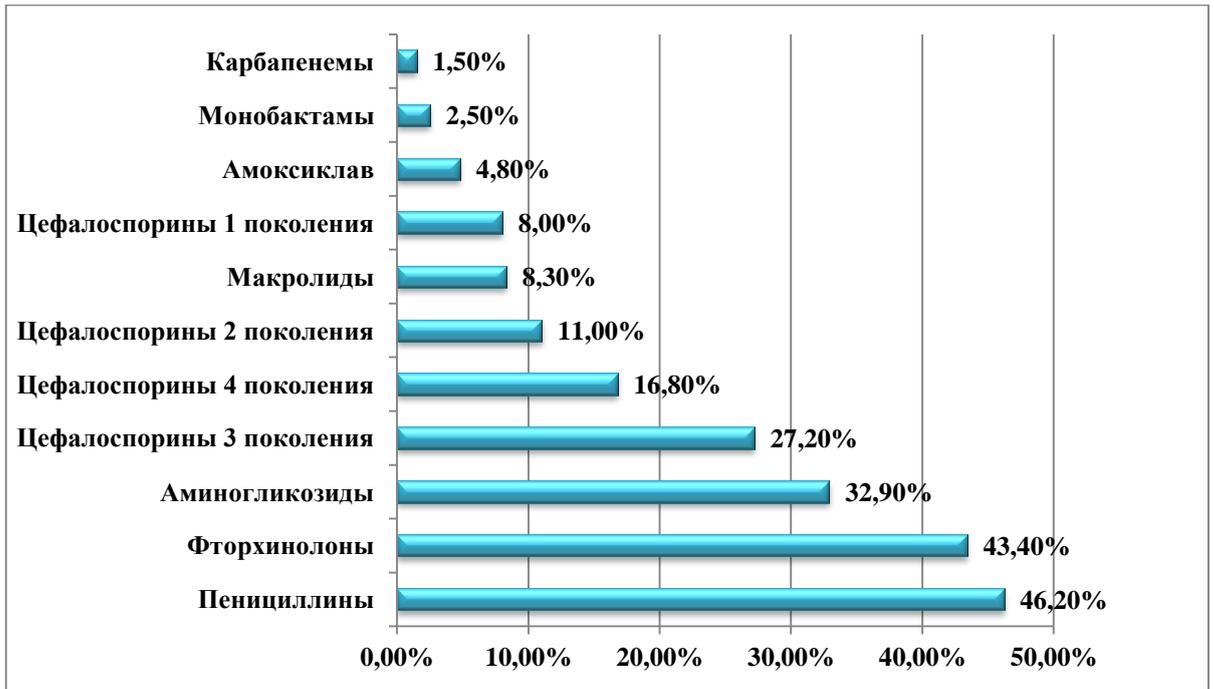
Нами проведен анализ резистентности основных возбудителей неонатальных пневмоний к антибактериальным препаратам. Было протестировано 654 штамма микроорганизмов, в том числе ведущие этиотропные патогены: *K. pneumoniae* – 187(28,6%); *S.epidermidis* – 172 (26,3%); *E. coli* – 93 (14,2%); *A. baumannii* – 54(8,2%); *S. haemolyticus* - 48 (7,3%); *Enterococcus spp.* – 38 (5,8%); *P. aeruginosa* – 36(5,6%); *Enterobacter* – 26(4%).



**Рис. 27 Соотношение выделенных этиопатогенов, протестированных на антибиотикорезистентность**

Для разработки рекомендаций по этиотропной терапии неонатальных пневмоний с учетом полученных данных по этиоструктуре нами проведена оценка устойчивости основных возбудителей к антибактериальным препаратам.

На Рисунке 28 представлена в ранговой последовательности резистентность к основным группам антибактериальных препаратов, применяемых в ОРИТН на момент проведения исследований.



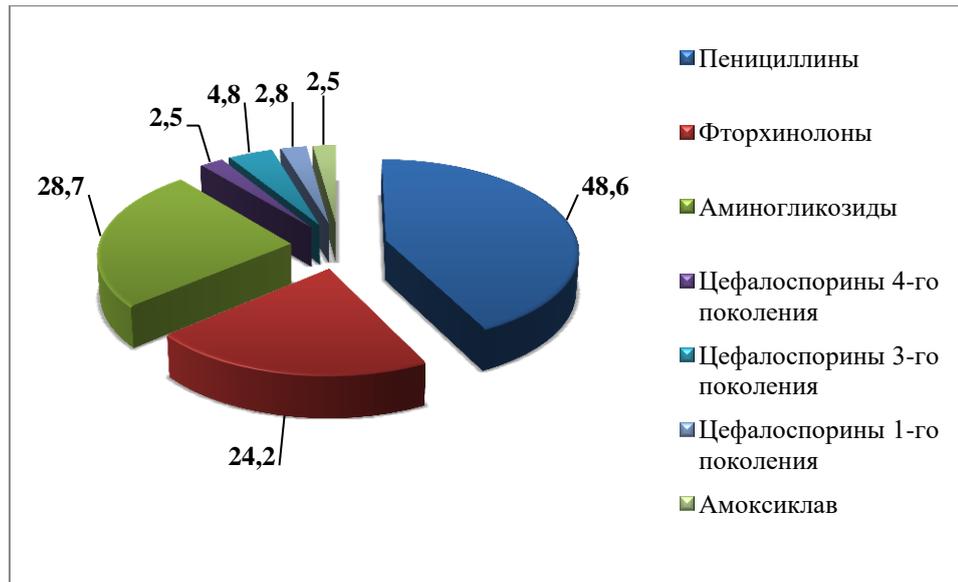
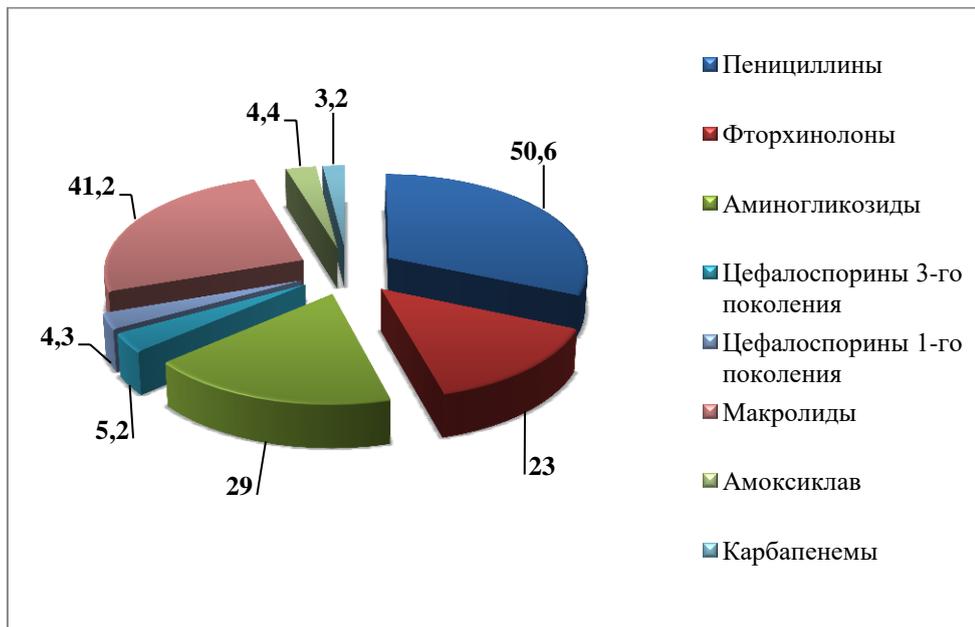
**Рис. 28 Резистентность возбудителей НП к антибактериальным препаратам**

Как видно из представленной диаграммы наибольшая резистентность выявлена у возбудителей неонатальных пневмоний к пенициллинам (Оксациллин, Амоксициллин) – 46,2%; фторхинолонам (Ципрофлоксацин, Ломефлоксацин) – 43,4%; аминогликозидам (Гентамицин, Тобрамицин) – 32,9%; цефалоспорином 3-го поколения (Цефиксим, Цефотаксим) – 27,2% и к цефалоспорином 4-го поколения (Цефепим) – 16,8%.

Незначительная устойчивость определялась к цефалоспорином 2-го поколения (Цефуроксим, Цефокситим) – 11%; макролидам (Азитромицин, Кларитромицин) – 8,3%; цефалоспорином 1-го поколения (Цефазолин, Цефтазидим) – 8%, Амоксиклаву – 4,8%, к монобактамам (Азтреонам) - 2,5% и карбапенемам (Меропенем, Имипенем) 1,5%.

На Рисунке 29 представлена оценка антибиотикорезистентности ведущих грамположительных этиопатогенов.

В клиническом материале от новорожденных с диагнозом ВУП, как уже было рассмотрено в предыдущих главах, чаще ( $p < 0,05$ ) преобладали микроорганизмы семейства *Staphylococcus spp.* - 53,3%.

*S. epidermidis**S. haemolyticus*

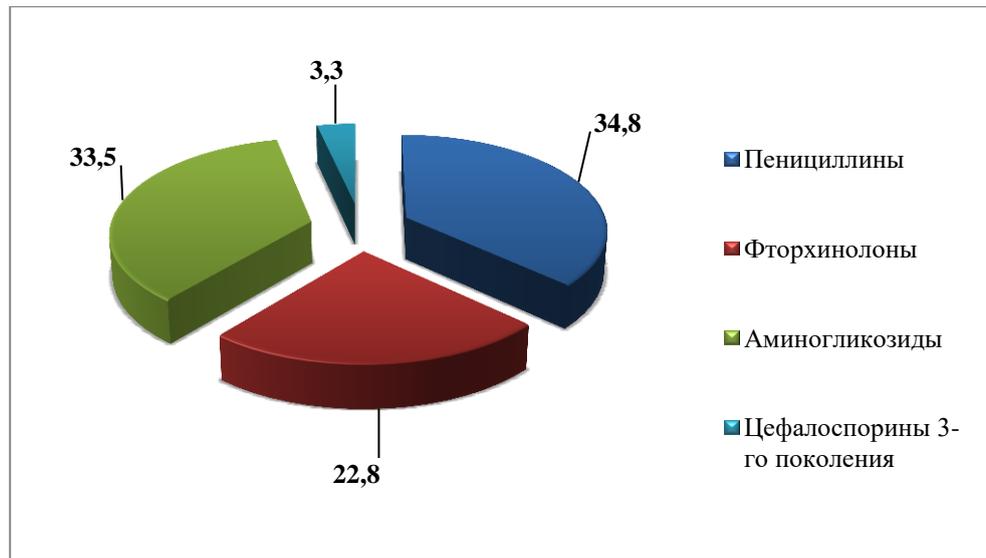
*Enterococcus spp.*

Рис. 29 Резистентность к антибиотикам основных грамположительных этиопатогенов НП

Проведенное нами изучение резистентности выделенных штаммов микроорганизмов к антибиотикам показало, что у большинства новорожденных неонатальные пневмонии были вызваны микроорганизмами, устойчивыми к широкому спектру антибиотиков.

Как видно из рисунка, штаммы *S. haemolyticus* проявляли резистентность к 8, у *S. epidermidis* резистентность отмечалась к 7, у *Enterococcus spp.* к 4 из 11 используемых в исследовании групп антибактериальных препаратов.

Практически ко всем изученным пенициллинам, аминогликозидам, а также фторхинолонам стафилококки проявляли резистентность.

Штаммы *S. haemolyticus* были устойчивы к пенициллинам (50,6%); фторхинолонам - 23% штаммов; аминогликозидам в 29%; проявляли резистентность к цефалоспорином 1 и 3-го поколения - 4,3% - 5,2% штаммов соответственно. К макролидам были устойчивы - 41,2% штаммов; к амоксициклаву - 4,4; карбопенемам - 3,2% штаммов.

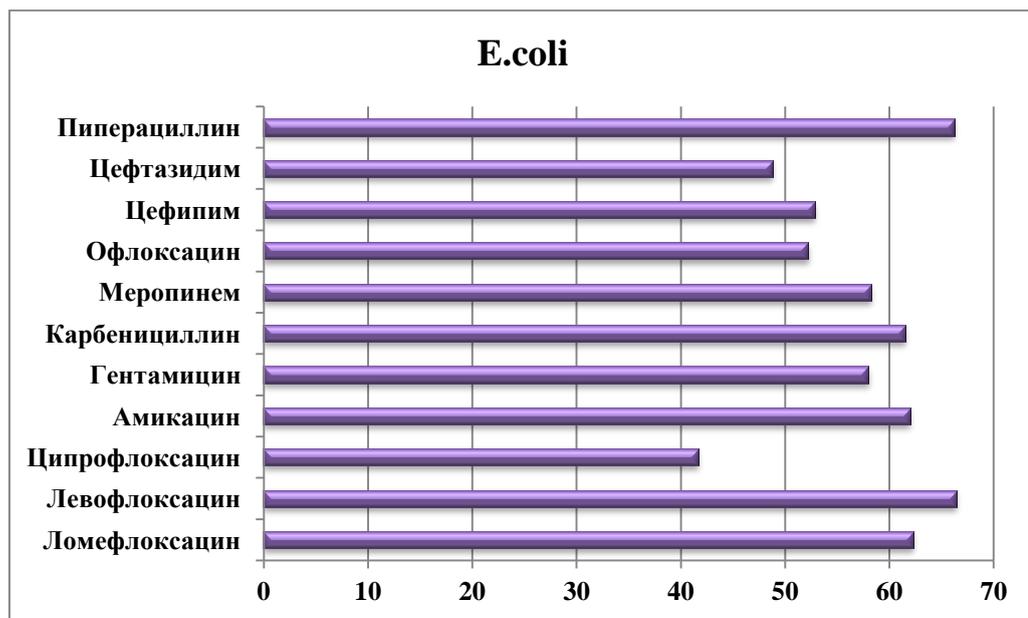
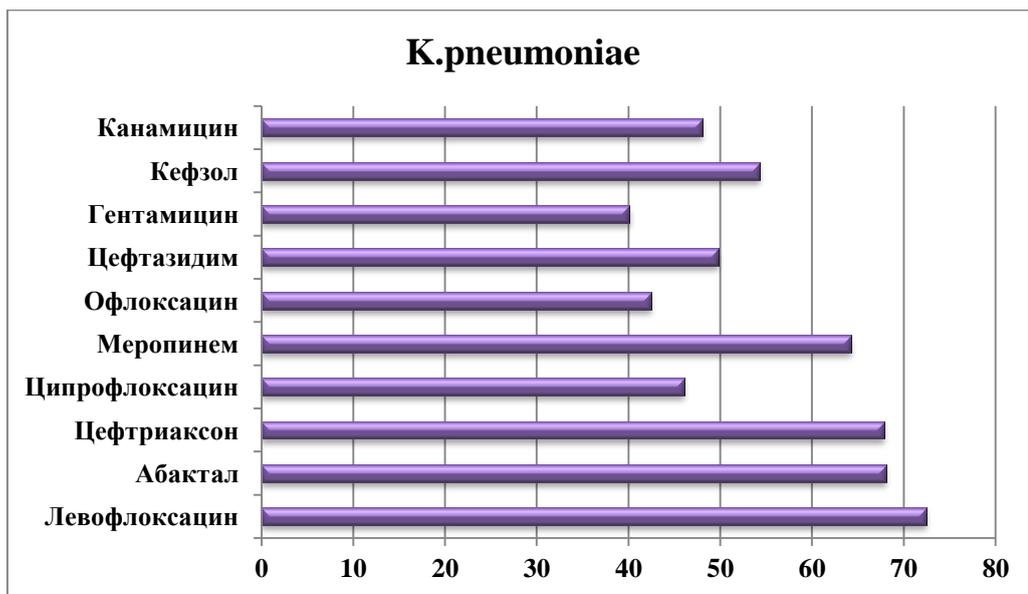
Схожая ситуация складывалась с резистентностью к антибиотикам штаммов *S.epidermidis*. Отмечалась высокая устойчивость к пенициллинам в 48,6% штаммов; аминогликазидам - 28,7% штаммов; фторхинолонам - 24,2% штаммов.

Штаммы *Enterococcus spp.* проявляли наибольшую устойчивость также к пенициллинам (34,8%); аминогликазидам - 33,5% штаммов; к фторхинолонам - 22,8% штаммов.

Анализ антибиотикорезистентности основных грамположительных патогенов выявил некоторые закономерности и позволяет использовать для этиотропной терапии неонатальных пневмоний, в частности ВУП, широкий спектр антибактериальных препаратов, за исключением препаратов пенициллинового ряда, высокая резистентность к которым *S. haemolyticus* обусловлена продукцией БЛРС.

Основные проблемы резистентности нозокомиальных штаммов энтеробактерий связаны с выработкой БЛРС. Бета-лактамазы - это ферменты, способные разрушать различные  $\beta$ -лактамы антибиотики. На сегодняшний день описано более 350 различных  $\beta$ -лактамаз, из них более 100 способны разрушать цефалоспорины широкого спектра (т.е. относятся к БЛРС), что обуславливает резистентность к цефалоспорином I-IV поколений [69]. Доказано, что выработка БЛРС нозокомиальными патогенами приводит к достоверному ухудшению исхода инфекции: повышению летальности, длительности госпитализации и стоимости лечения [69].

Для определения тактики этиотропной антибактериальной терапии и разработки эмпирической терапии с учетом региональных особенностей, был проанализирован уровень чувствительности к антибактериальным препаратам грамотрицательных бактерий (ГОб), возбудителей неонатальных пневмоний. Данные представлены на рисунке 30.



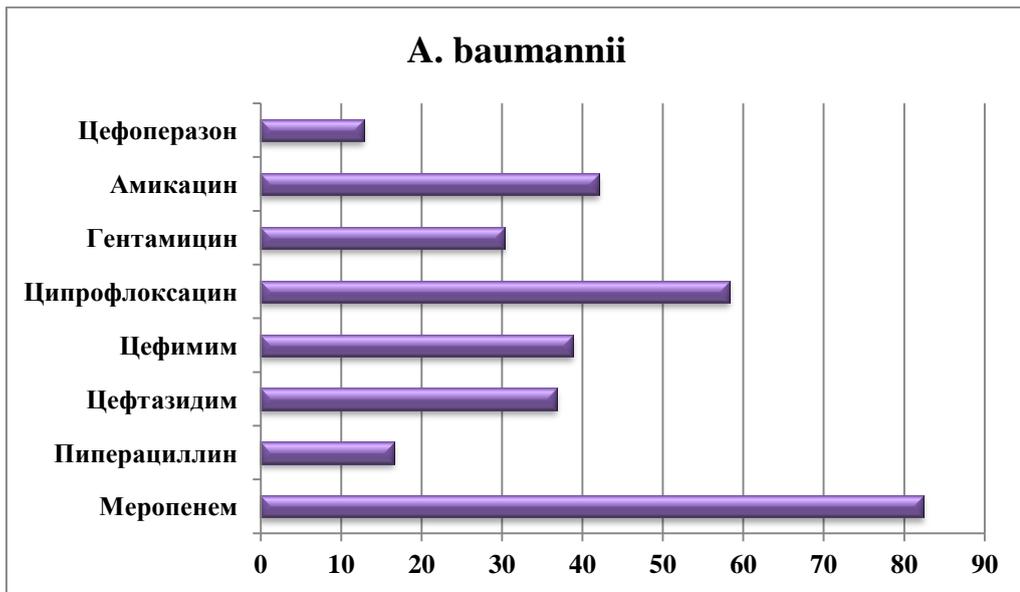
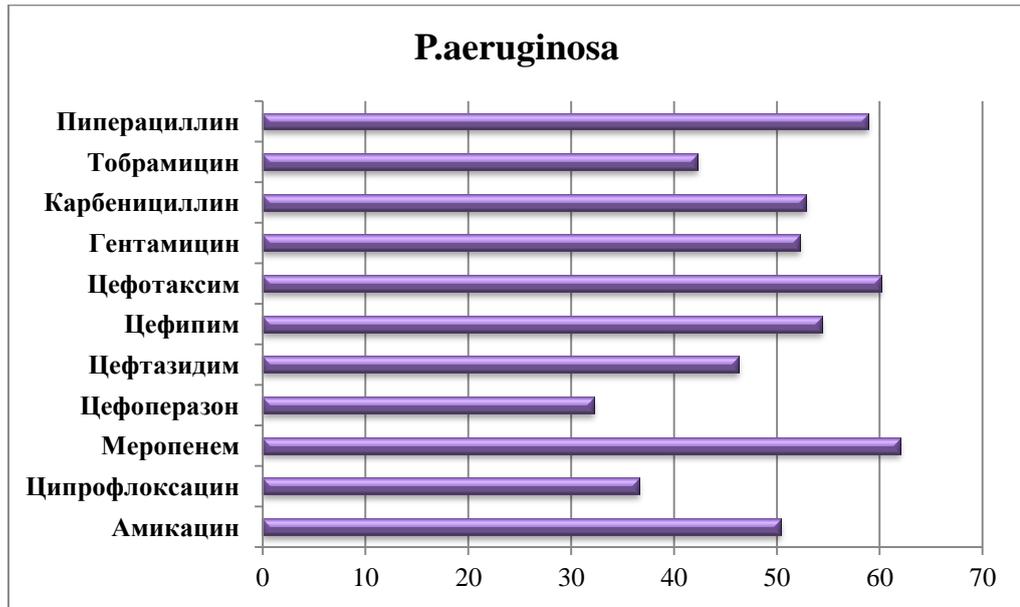


Рис. 30 Чувствительность к антибиотикам (в %) штаммов *K.pneumoniae* (n=26), *E.coli* (n=18), *P.aeruginosa* (n=12) и *A. baumannii* (n=10) выделенных от новорожденных с РНП

Как видно из рисунка активность карбопенемов сохраняется в отношении выделенных штаммов *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa* и *E.coli* в 64,2, 58,2 и 62%,

соответственно. При анализе чувствительности к АБП обращает на себя внимание высокая частота резистентности *K.pneumoniae* и *E.coli* к левофлоксацину 72,4 – 66,4%, тогда как у *P.aeruginosa* отмечается чувствительность к меропенему - 62% штаммов соответственно. К ципрофлоксацину нечувствительными были 63,0% штаммов клебсиелл, 68,3% выделенных кишечных палочек и 63,4% псевдомонад. Отмечалась умеренная чувствительность к цефтазидиму у *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa* и *E.coli* – 49,8, 48,6 и 46,2% штаммов соответственно.

Высокую частоту БЛРС-продуцентов среди исследованных штаммов *K.pneumoniae* позволила предположить низкая активность (>50% нечувствительных штаммов) к цефалоспорином III-IV поколения.

Штаммы *K.pneumoniae*, выделенные из ТБА проявляли чувствительность в 68,06%- к абакталу и 67,8% штаммов к цефтриаксону; 66,2% - *E.coli* и 58,8% - *P.aeruginosa* были чувствительны к пиперациллину.

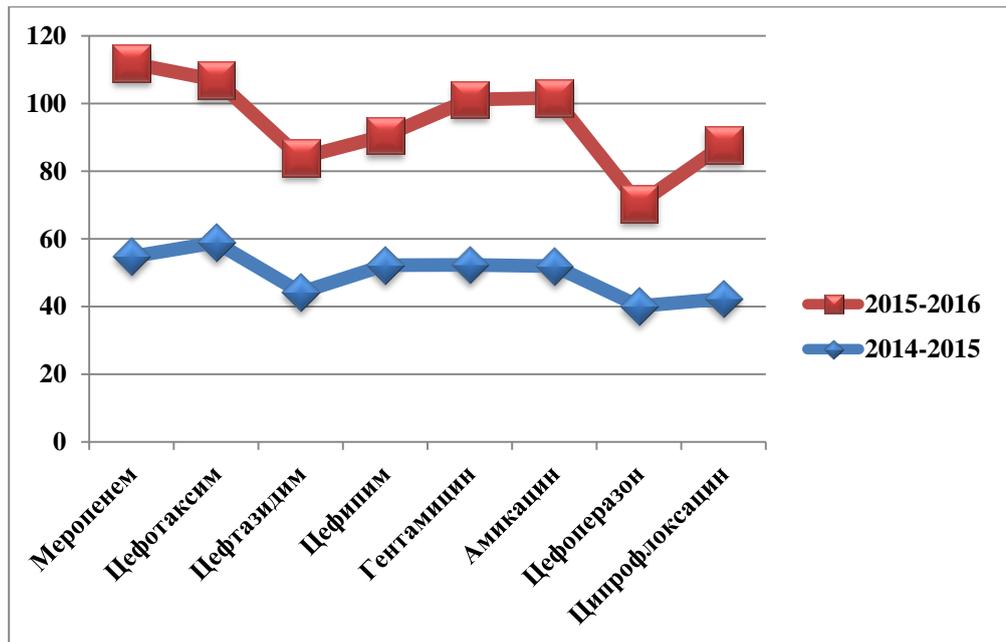
В настоящее время *A. baumannii* является «проблемным» возбудителем ИСМП, поражающим преимущественно новорожденных, находящихся в тяжелом клиническом состоянии в ОРИТН. *A. baumannii* хорошо адаптирован к обитанию в госпитальной среде и обладает высокой резистентностью к большинству антисептических и антимикробных препаратов.

Традиционно активными в отношении *A. baumannii* были карбопенемы. Максимальную активность демонстрировал меропенем (82,4%).

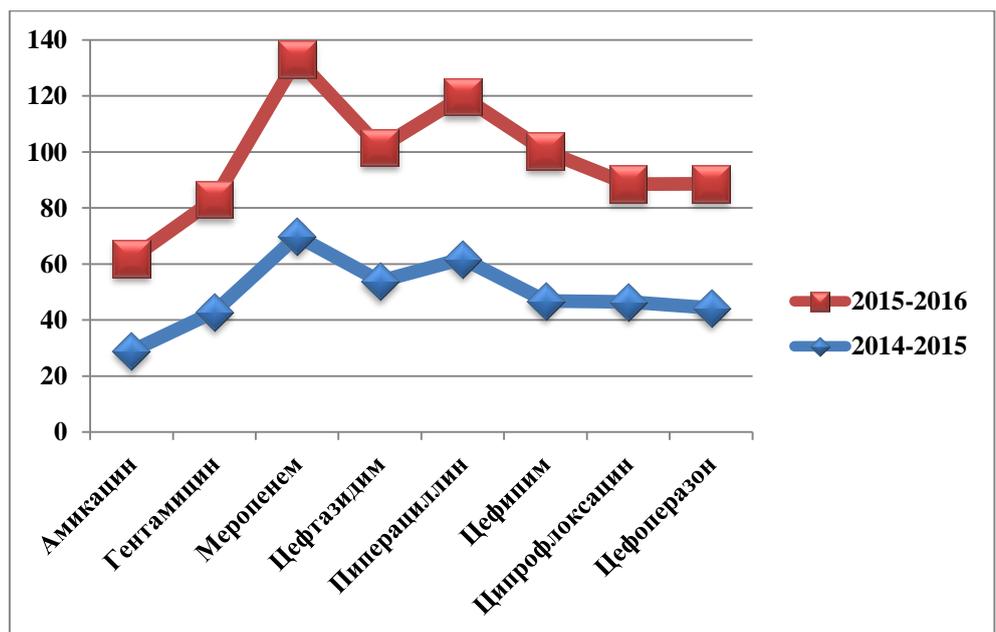
Пиперациллин и Цефоперазон демонстрировали высокую резистентность в отношении штаммов *A. baumannii*: нечувствительными к нему были – 83,5% и 87,2% выделенных культур, соответственно.

Из цефалоспоринов наибольшей активностью обладали цефепим и цефтазидим: резистентность была отмечена у 61,2 и 63,2% штаммов соответственно.

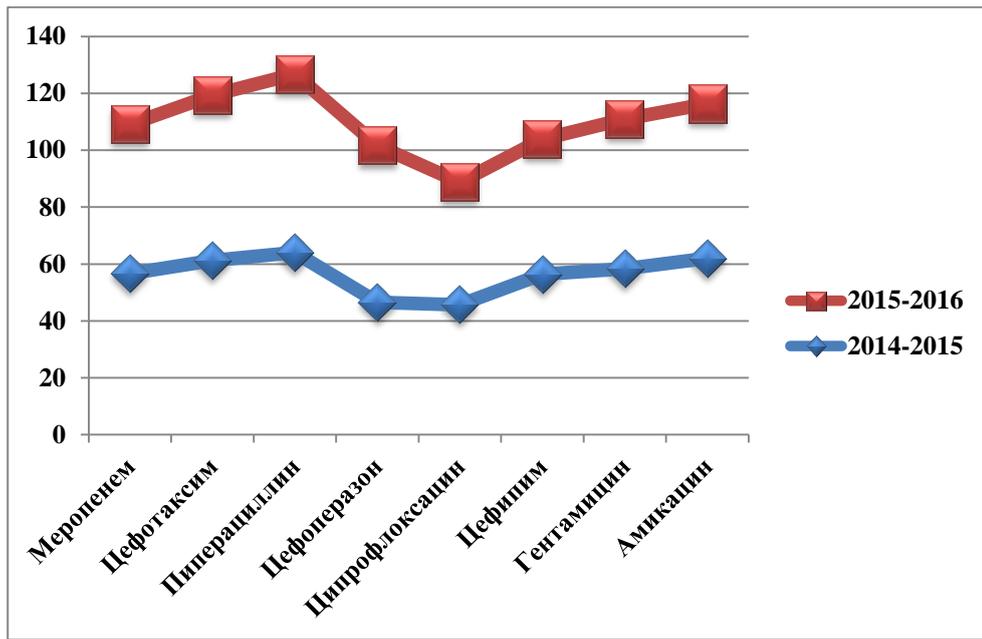
При сравнении результатов исследований проведенных в 2014-2015 гг. и 2015-2016 гг., сохранение высокой активности в отношении выделенных штаммов *K.pneumoniae*, *E.coli*, *P.aeruginosa* и *A. baumannii*, отмечено только у меропенема, и пиперациллина, резистентность к остальным антибиотикам возрасла. Динамика сравнения активности АБП представлена на рисунке 31.



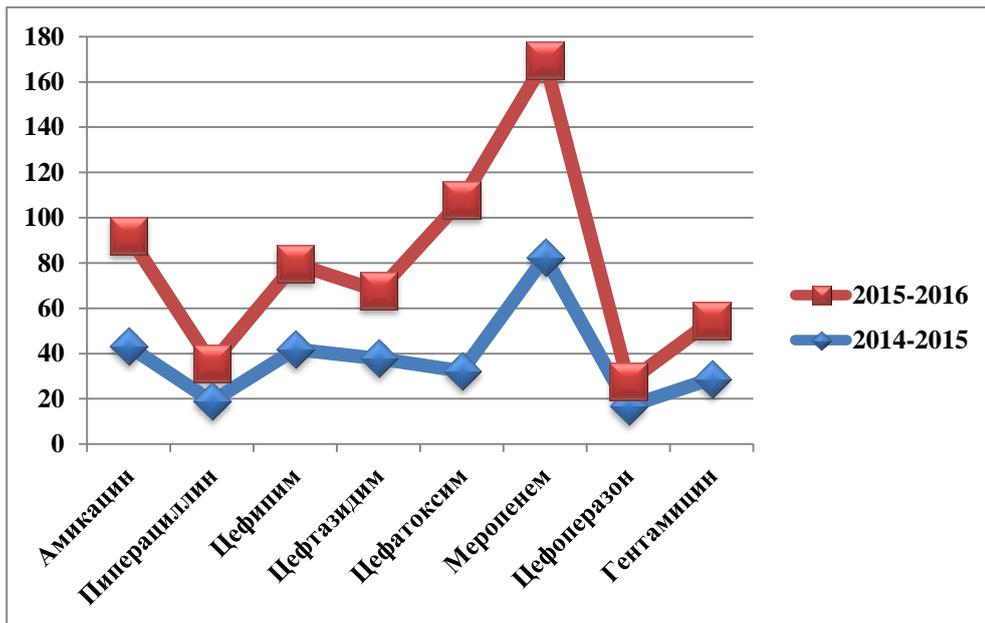
1



2



3



4

Рис. 31 Динамика активности АБП *in vitro* (в %) в отношении *P.aeruginosa* (1), *K.pneumoniae* (2), *E.coli* (3) и *A. baumannii* (4), выделенных у новорожденных с РНП ОРИТН родильного дома в 2014-2016 гг.

Характеризуя антибиотикорезистентность основных грамотрицательных возбудителей неонатальных пневмоний, необходимо отметить высокую резистентность *K. pneumoniae* к фторхинолонам – 52,2%; аминогликозидам – 51,6%; пенициллинам – 49,8%; цефалоспорином 3-го поколения – 29,8%. Практически отсутствует устойчивость к макролидам – 1,7%. Не выявлено штаммов *K. pneumoniae* устойчивых к монобактамам.

Штаммы *E. coli* проявляли наибольшую устойчивость к пенициллинам – 40,2%; фторхинолонам – 36,6%; аминогликозидам – 32,2%; цефалоспорином 3-го поколения – 29,8%. Почти отсутствует устойчивость к макролидам – 1,2%.

Не выявлено штаммов *E. coli*, устойчивых монобактамам и цефалоспорином 2-го поколения.

Штаммы *A. baumannii* были устойчивы к фторхинолонам – 62,8%; аминогликозидам – 58,3%; пенициллинам – 45,3%; цефалоспорином 3-го поколения – 49,7%; цефалоспорином 4-го поколения – 39,8%. Практически не отмечается резистентности к амоксиклаву – 1,2%.

Необходимо отметить значительную устойчивость *P. aeruginosa* к фторхинолонам в 56% случаев; аминогликозидам – в 43,2%; цефалоспорином 3-го поколения – в 39%; карбапенемам – в 32%; цефалоспорином 4-го поколения – 26,2%. Отсутствует резистентность выделенных штаммов *P. aeruginosa* к макролидам и амоксиклаву.

Между заболеваемостью новорожденных неонатальными пневмониями и резистентностью к антибактериальным препаратам имеется умеренная положительная связь ( $r_{xy}=0,23$ ;  $p < 0,05$ ), что свидетельствует о возможности формирования в ОРИТН «госпитальных» штаммов, которые и вызывают данные инфекционные осложнения.

Полученные нами данные позволяют рекомендовать для проведения этиотропной терапии цефалоспорины 2-го поколения, или карбапенемы в виде монотерапии. В более тяжелых ситуациях можно рекомендовать комбинации макролидов с монобактамами и амоксиклавом.

Таким образом, по результатам исследования можно сделать заключение об использовании антибактериальных препаратов для проведения этиотропной терапии. Повышению уровня резистентности АБП в ОРИТН родильного дома РКБ послужили такие факторы, как планирование антибактериальной терапии без учета региональных тенденций резистентности возбудителей, а также неправильный выбор препарата и необоснованная продолжительность.

## ГЛАВА 7. КОМПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ ЭКСПРЕССИОННЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧЕК РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА У НОВОРОЖДЕННЫХ С ВУП И РНП

Предрасположенность новорожденных к возникновению инфекционных осложнений может быть обусловлена не только особенностями госпитальных штаммов микроорганизмов, но и состоянием иммунной системы новорожденных детей.

В соответствие с принципом регионализации, с учетом различной оснащенности лечебных учреждений и в связи с появлением новых методов диагностики и терапии (антибактериальной, респираторной и др.), мы оценили возможность использования тех или иных признаков для диагностики пневмонии.

В неонатальном периоде приобретенный компонент иммунной системы характеризуется значительной незрелостью, в связи, с чем у новорожденных детей, в частности у недоношенных, отсутствует иммунологическая память и снижена способность к формированию специфических антител к патогенам [8]. Поэтому защита от инфекции в этот период зависит главным образом от врожденного иммунитета.

Большое значение в распознавании патогенов имеют факторы врожденного иммунитета (Toll-подобные рецепторы, цитокины, противомикробные пептиды) [23], которые распознают консервативные области вышеперечисленных микроорганизмов. Для успешной борьбы с пневмониями новорожденных требуется знание не только клинко-микробиологических, но и иммунологических особенностей данной патологии. В связи с этим одной из задач данной работы являлось изучение микробиоты и факторов врожденного иммунитета (*TLR2*, *TLR4*, *HBD-1*, *HBD-2*, *TNF $\alpha$*  и *NF- $\kappa$ B*) на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей при внутриутробном инфицировании плода и развития ранней неонатальной пневмонии.

Нами проведено изучение микрофлоры и факторов врожденного иммунитета (*TLR2*, *TLR4*, *HBD-1*, *HBD-2*, *TNF $\alpha$*  и *NF- $\kappa$ B*) на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей при внутриутробном инфицировании плода и пневмонии новорожденных.

Слизистые оболочки респираторного тракта представляют собой естественный физиологический барьер. Эпителиальная ткань в первую очередь контактирует с окружающей средой, реагирует на патогены и «включает» механизмы врожденного иммунитета. Особое значение врожденный мукозальный иммунитет имеет у новорожденных [85].

Известно, что в последние годы одной из главных социальных проблем является пневмония новорожденных [17]. Так, для понимания патогенеза пневмонии новорожденных требуется знание не только клинических и микробиологических, но также иммунологических особенностей исследуемой патологии. Причем иммунные нарушения, которые приводят к распространению инфекции, могут определяться как у новорожденного, так и у матери.

Как уже неоднократно упоминалось: большое значение в распознавании патогенов имеют факторы врожденного иммунитета (Toll-подобные рецепторы, цитокины, противомикробные пептиды и др.) [23]. Известно, что механизмы врожденного иммунитета запускаются после распознавания патогенов Toll-подобными рецепторами. Установлено, что уровень экспрессии мРНК TLR варьирует на протяжении респираторного тракта [22]. Активация TLRs приводит к продукции эффекторных факторов эпителиальными клетками. Среди таких эффекторных молекул выделяют провоспалительные цитокины, противомикробные пептиды, молекулы адгезии, белки острой фазы и др.

В данном разделе будет проведена сравнительная оценка роли ключевых компонентов врожденного иммунитета: TLRs, сигнальных молекул и эффекторных молекул (противомикробных пептидов, цитокинов) в слизистых оболочках респираторного тракта у здоровых новорожденных детей, новорожденных с ВУП и РНП.

На первом этапе будут представлены данные по биоинформационному анализу, который позволит выявить некоторые факторы врожденного иммунитета, которые потенциально могут играть значительную роль в патогенезе пневмонии новорожденных. Далее, на основании анализа будут выбраны несколько показателей и проведена оценка их экспрессии в эпителиальных клетках верхних дыхательных путей у здоровых новорожденных, у новорожденных с внутриутробной пневмонией и ранней неонатальной пневмонией, а также показана роль патогена в изменении экспрессионного профиля факторов врожденного иммунитета.

### **7.1. Биоинформационный анализ молекулярно-генетических процессов при неонатальных пневмониях**

Понимание причин пневмонии новорожденных является сложной исследовательской проблемой, поскольку факторы риска и патофизиологические пути заболевания сложны и до сих пор плохо изучены. Не существует единой теории развития пневмонии. Есть много «патологических» путей, которые могут привести к внутриутробной инфекции и/или к развитию РНП.

Принято считать, что внутриутробная инфекция и/или инфекция с которыми «сталкивается» новорожденный после родов в более чем половине случаев приводит к развитию патологии, в большом проценте случаев - к пневмонии [144; 185]. Микробные инвазии амниотической полости, активируют рецепторы распознавания паттернов, которые индуцируют выработку провоспалительных медиаторов, приводящих не только к преждевременным родам, но и к инфицированию плода [157]. К тому же хроническое воздействие на плод этих медиаторов воспаления может привести к синдрому воспалительной реакции плода и поставить под угрозу здоровье и развитие новорожденных [158; 187].

Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что степень бактериальной колонизации, пути заражения и стимулирующая способность бактерий играют

ключевую роль в активации провоспалительных сигнальных каскадов у матери и плода. Некоторые сигнальные каскады индуцируют выработку провоспалительных цитокинов (например, *IL-1*, *TNF- $\alpha$*  и др.) и хемокинов (например, *ИЛ-8*, *МСП-1* и др.), которые, в свою очередь, способствуют наработке простагландинов (PG), сократимости миометрия, созреванию шейки матки, и деградации мембраны плода, что приводит к преждевременным родам [147].

Нами было показано, что 181 ген имеет отношение к пневмонии, и все они вовлечены в активацию иммунной системы и воспалительный ответ. Мы также провели сепарацию генов по количеству библиографических источников и рассматривали в дальнейшей работе только те гены, количество работ, посвященных которым, было более двух. Проанализировав список генов, имеющих отношение к пневмонии новорожденных, мы выделили наиболее релевантные рецепторы распознавания паттернов, как мембранные, так и цитоплазматические и другие молекулы. При анализе использовали данные представленные в базе данных ResNet (Ariadne® Expression Targets Pathways). Наиболее релевантными оказались основные модуляторы воспалительных сигнальных путей, которые активируются бактериальными инфекционными триггерами - Toll-подобные рецепторы (*TLRs*) и др. [213; 179]. Сигнальный путь рецепторов распознавания паттернов при пневмонии новорожденных показан на Рисунке 29.

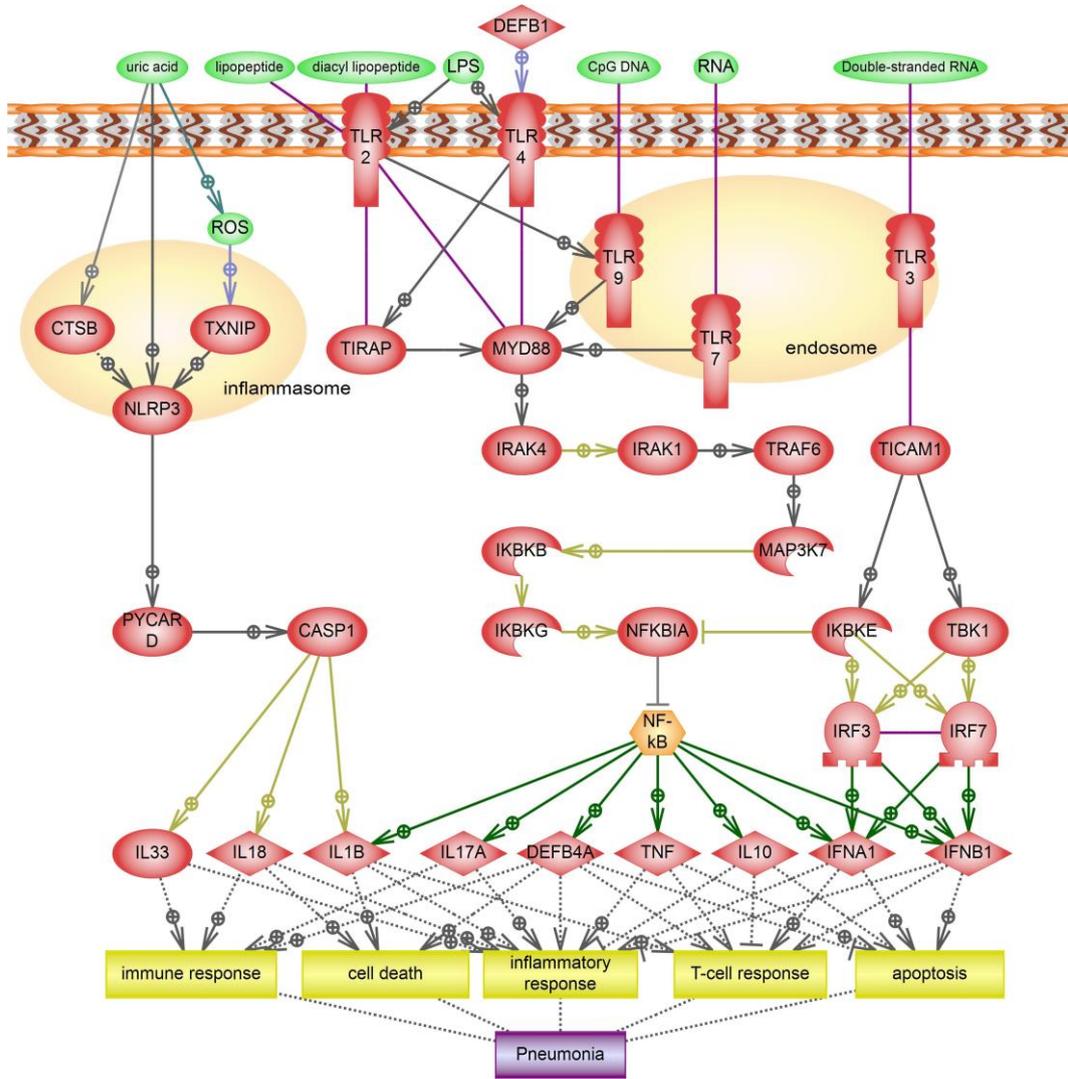


Рис. 32 **Сигнальный путь рецепторов распознавания паттернов при пневмонии новорожденных**

Условные обозначения:



На следующем этапе был проведен анализ обогащения по имеющимся картам канонических сигнальных путей (pathway enrichment analysis), в результате которого были определены сигнальные пути, регулируемые различными гормонами, цитокинами и пептидными лигандами, в которых эти гены были

представлены. Из полученных данных были отобраны сигнальные и регуляторные механизмы с наибольшим представительством генов. Данные отображены в Таблице 26.

Таблица 26

**Результаты анализа обогащения по картам канонических сигнальных путей для наиболее релевантных карт**

Ассоциация	Смысл (текст)	Connectivity	Кол-во ссылок
Pneumonia - --> TLR4	В результате генетических исследований обнаружена связь между полиморфизмом TLR4 A299G и риском развития пневмонии. Расхождение полиморфизмов TLR4 Asp299Gly и Thr399 Ile было независимо от факторов риска развития сепсиса и пневмонии.	2	18
Pneumonia - --> TLR2	Дефицит TLR2 уменьшает воспаление легких и последствий поражения легочной ткани. На модели мышей с пневмонией вызванной <i>P.aeruginosa</i> , дефицит TLR2 улучшает выживаемость путем эффективной антибактериальной терапии и восстановления баланса провоспалительных цитокинов в легких.	2	10
Pneumonia - --> NOD2	Мутации гена NOD2 сопровождаются последующим снижением распознавания мурамилпептидов, связано это с хроническим воспалением кишечника и легочными осложнениями у пациентов с аллогенной трансплантацией стволовых клеток и сепсисом.	2	3
Pneumonia - --> CCR1	Дефицит и удаление гена CCR1 у мышей препятствовал воспалению легких и вторичного острого панкреатита.	2	3
Pneumonia - --> IL17A	Дефицит гена IL-17A приводит к сокращению снижения антиген-специфического Т-клеточного иммунного ответа, в том числе аллерген-индуцированного воспаления	2	6

	дыхательных путей вызванных <i>Chlamydia pneumoniae</i> . Недостаток или истощение IL-17 облегчает воспаление легких и развитие иммунопатологии и улучшает выживаемость, в то время как это не влияет отрицательно на клиренс вируса.		
Pneumonia - --> TLR5	Снижение функции TLR5 SNP, Arg392Stop полиморфизма происходит примерно у 10% от общей численности населения. Отмечается снижение восприимчивости к пневмониям, вызванных <i>Legionella pneumophila</i> .	2	4
Pneumonia - --> TNF	Кроме того, полиморфизм гена TNF-308A/G не играет роли при пневмонии риск смертности. Полиморфизм гена TNF, в частности – 238 А аллелей и гаплотипов, раскрыты наиболее яркие и последовательные ассоциации с пневмонией.	2	7
Pneumonia - --> IL1RN	Полиморфизм IL-1 был ассоциирован с риском множественной лекарственной устойчивостью <i>baumannii</i> , связанные с инфекциями, вызванными <i>acinetobacter</i> пневмонии. Например, IL-1RA полиморфизм связан с риском множественной лекарственной устойчивостью <i>Acinetobacter baumannii</i> , связанных с развитием пневмонии.	2	4
Pneumonia - --> IL6	Мета-анализ показывает, что существует значительно повышенный риск развития пневмонии, связанный с полиморфизмом IL-6 и IL-10. В отличие от IL-6 индуцирует фосфорилирование сигнальный трансдуктор и активатор транскрипции 1 и STAT3 в легких, и STAT1 и STAT3 фосфорилирования при пневмонии, вызванной <i>E. coli</i> снизилась с дефицитом IL-6. Генетической предрасположенности к внебольничной пневмонии и нозокомиальной пневмонии приписывается накопительный вклад полиморфизмов в CYP1A1, IL-6, и ген ACE,	2	10

	независимо от возраста, пола, этиологии, и применение механической вентиляции, у пациентов в Российской Федерации.		
Pneumonia - --> DOCK8	Большинство пациентов с дефицитом DOCK8 (>90%) имеют рецидивирующие инфекции верхних дыхательных путей, пневмонии, гаймориты и отиты др. В отличие от мутации гена STAT-3, синдрома гиперпродукции IgE, при пневмониях с дефицитом DOCK8 не в первую очередь за счет <i>S. aureus</i> , но довольно широкого спектра грам-положительных и грам-отрицательных бактерий и грибов.	2	6
Pneumonia - --> TGFB1	Несколько исследований посвящены возможным корреляциям между полиморфизмом однонуклеотидных генов TGF и RT - индуцированные пневмонии в развитии рака легких пациентов.	2	4
Pneumonia - --> CXCL8	Проводился анализ 200 пациентов с внебольнично приобретенной пневмонией для одиночных нуклеотидных полиморфизмов IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, TNF-a и гены RANTES. Предыдущие исследования показали связь между IL-8-251A/T полиморфизма IL-8 с развитием различных клинических ситуаций (диарея, язва двенадцатиперстной кишки, рак желудка, ХОБЛ, пневмония).	2	4
Pneumonia - --> IL10	Данные мета - анализа показывают, что существует значительно высокий риск развития пневмонии, связанный с ранее отмеченными, полиморфизмом IL-6 и IL-10. Таким образом, полиморфизм в гене IL-10 могут быть предикторами исхода у пациентов с сепсисом от пневмонии.	2	15
Pneumonia - --> IL13	Риск развития пневмонии также был модулирован полиморфизмом в анти-воспалительных генах, включая генетические вариации в IL13, rs 20541 и rs 180925 который	2	4

	<p>повышал риск (OR:2.95, 95% ди 1.14-7.63 и HR:3.23, 95% ди:1.03-10.18, соответственно). Дефицит их значительно сказывался на развитии легочных воспалений, которые появляются после повторной OVA стимуляции. Предполагается, что CD4 Т-клеток, полученных IL4/IL13 могут усиливать эти врожденные реакции с продолжительными осложнениями.</p>		
Pneumonia - --> NOS2	<p>Хроническое воспаление прогнозирует развития опухолей легких у мышей. Дефицит гена iNOS защищает зараженных мышей от воспаления легких и смерти.</p> <p>В двух различных исследованиях, при недостатке или дефиците гена iNOS при лечении ингибиторами не оказывает влияния на воспаление легких.</p> <p>Совсем недавно мы обнаружили, что перепроизводство оксида азота гена iNOS ускорило вирусную мутацию мышинной пневмонии, вызванной рекомбинантным вирусом Сендай.</p>	2	10
Pneumonia - --> SFTPA1	<p>Дефицит гена SP-A в легких недоношенных ведет к задержке формирования мочевины, что сопровождается развитием воспаления легких. У белок- А дефицитных мышей наблюдается повышенная предрасположенность к легочным инфекциям с различными бактериальными и вирусными патогенами, а SP -дефицит связан с повышенным воспалением легких. Хотя заболевание человека в результате мутации или делеции в генах SP -А и SP -D не выявлено, разнообразие клинических состояний, характеризующихся повышенным воспалением или повреждением легочной паренхимы связаны с измененными уровнями SP -А и SP-D в бронхоальвеолярной лаважной жидкости.</p>	2	4
Pneumonia - --> CXCR3	<p>В этой работе было продемонстрировано удаление гена CXCR3 у мышей, что значительно предотвращало воспаление</p>	2	3

	легких, индуцированного воздействием дыма сигарет. Также выявлено отношение CXCR3 к астме.		
Pneumonia - --> CLEC4D	Дефицит гена Clec4e связан с обострением воспаления легких, характеризующийся повышением нейтрофилов.	2	1
Pneumonia - --> VDR	Возможно, что дефицит витамин D, или недостаток VDR может вызвать воспаление легких и изменения в функцию легки (дисбаланс протеиназ/ антипротеиназ). Далее в подтверждение этой теории было проведено исследование иллюстрирующее, что удаление рецепторов витамина D, поддержка этой теории лежит исследование свидетельствует о том, что удаление рецепторов витамина D (VDR) приводит к повышению IL-5 и IL-13 и воспалению легких. Мутации рецепторов витамина D не поддающиеся лечению и, к сожалению, впоследствии мыши скончались от пневмонии.	2	3
Pneumonia - --> MMP13	В резюме - легочное воспаление и фиброз у мышинной модели, вызванной радиацией, было использовано для выявления связи между дефицитом MMP13 и развития фиброза после одной дозы облучения в 20 Gy.	2	1
Pneumonia - --> NLRP3	Дефицит или недостаток генов Pycard и Nlrp3, также приводит к воспалению в легких, а снижение воспаления коррелирует с повышенной смертностью. Отмечается, что дефицит Nlrp3 не влияет на острое воспаление легких, так как количество макрофагов, нейтрофилов, DCS и CD4+ и CD 8+ Т-клеток существенно не отличаются от дикого типа и Nlrp3 нокаут мышей (данные не показаны).	2	2
Pneumonia - --> CCL2	Впервые проведенное исследование, где рассматривается одновременно полиморфизмы генов CCR5 и CCL5, CCL2 и CCR2 и CX3CR1 и их значение в воспалении	2	2

	<p>легких.</p> <p>Указывается противоречивая роль MCP-1 при воспалении легких: дефицит MCP-1 ослабляется, а не усиливается TNF, в то же время, имеется потенцирующее влияние секреции IL-10 на ранней стадии развития.</p>		
Pneumonia - --> IFNGR1	У 3-летней девочки с аутосомно-рецессивным дефицитом IFN развивается пневмония и узловатая эритема. Клинический диагноз туберкулеза был поставлен на основе развития гиперчувствительности замедленного типа на туберкулин.	2	1
Pneumonia - --> TNFRSF11 A	Самое главное, решающую роль RANK/RANKL в регуляции лихорадки при пневмонии. Двое детей с RANK мутации были госпитализированы по поводу пневмонии, но ни разу не поднялась температура.	2	1
Pneumonia - --> STAT4	Чтобы определить, есть ли дефицит или недостаток IL-12 p40 или недостаток STAT4 и как влияют клетки <i>P. aeruginosa</i> - индуцированного воспаления легких, выбрали определение уровня продукции TNF и IL-1.	2	1
Pneumonia - --> MIF	Сделан вывод, что генетические вариации в гене MIF может повлиять на исход пневмонии.	2	1
Pneumonia - --> MMP28	Удаление MMP-28 также может увеличить инфильтрацию макрофагов в легких при пневмонии и способствует апоптозу эпителиальных клеток дыхательных путей, вызванных гриппом.	2	1
Pneumonia - --> MTHFR	В частности, патогенез тромбоза глубоких вен был обусловлен множеством факторов, таких как продолжительная иммобилизация и пневмония, прием оральных контрацептивов.	2	1
Pneumonia - --> IRAK3	Обнаружено, что дефицит IRAK-M ослабляет способность дексаметазона подавлять	2	2

	воспаление легких, вызванного NTHi инфекции. Тем не менее, текущие данные свидетельствуют о том, что в ходе пневмонии, вызванной <i>Klebsiella pneumonia</i> in vivo дефицит IRAK-M не влияет в значительной степени на высвобождение медиатора провоспалительных респираторных эпителиальных клеток.		
Pneumonia - --> LTA	Результаты исследования показывают, что полиморфизм гена TNF может быть полезным для прогнозирования пневмонии, отсюда и выявлении лиц, которые могли бы извлечь пользу от превентивного лечения и менее мощным режима иммуносупрессии.	2	1
Pneumonia - --> TNBD	Мутация тромбомодулина, что ухудшает дальнейшую генерацию APC, в результате неконтролируемого воспаления легких во время мышиного туберкулеза.	2	1
Pneumonia - --> MYD88	Есть концепция, что пациенты с мутацией гена IRAK4 и MyD88 подвержены серьезным гнойным инфекциям, вызванных <i>S. pneumonia</i> и <i>S. aureus</i> , а пациенты с мутацией гена TLR3 и UNC93B подвержены развитию герпеса и энцефалита.	2	1
Pneumonia - --> TGFBR2	У мышей с дефицитом TGF R2 при эпителиальной недостаточности легких наблюдалось улучшение альвеолярного эпителия и выживаемость клеток, несмотря на воспаление легких, после введения блеомицина.	2	2
Pneumonia - --> IL2	IL-2 влияет на воспаление кожи и легких при определенных условиях. Дефицит IL-2 сопровождается портальным и перипортальным гепатитом, панкреатитом, пневмонией, миокардитом, тяжелыми аутоиммунными гемолитическими анемиями, и смертельными исходами в течение от 4 до 5 недель после рождения.	2	2

Pneumonia - --> MIR223	В мышинной модели, мутации гена miR-223 привели к нейтрофильному воспалению легких и увеличению разрушения ткани после действия эндотоксина, продолжив свое участие в производстве гранулоцитов и воспалении легких.	2	1
Pneumonia - --> CPB2	Наблюдения показывают, что дефицит гена TAF 1 защищает от воспаления легких.	2	1
Pneumonia - --> MMP9	Хотя типичные легочные воспаления и фиброзы происходят при дефиците желатиназы, в альвеолах по сути отсутствуют, а это является отличительной особенностью поражения легких, вызванных применением блеомицином. Механизм, с помощью которого дефицит ММП-9 вызывает гибель клеток остается неясным, но недавнее исследование взрослых мышей показали, что дефицит ММП-9 увеличивает легочную апоптоз аллерген-индуцированного воспаления легких.	2	2
Pneumonia - --> IL4R	Толчком к развитию аллергических заболеваний (атопического дерматита, аллергического ринита и аллергической астмы) является, в частности, путем демонстрации, что IL-4, IL-5, и IL-13 играют важную роль в моделях аллергического воспаления легких и из-за идентификации TSLP, IL4/13, and IL4R, SNPs, ассоциированных с восприимчивостью к атопическим дерматитам и астме.	2	1
Pneumonia - --> TNFRSF1B	Проведены исследования влияния дефицита TNF R2 на системное и легочное воспаление у тучных мышей Crefat, используя Bioplex и иммуноферментный анализ.	2	1
Pneumonia - --> HTRA1	Удаление гена HtrA из штамма D39 из пневмококка полностью отменил его вирулентность в мышинных моделях пневмонии и бактериемии, в то время как	2	1

	вирулентность второго штамма (TIGR4) резко сократилась.		
Pneumonia - --> IL1B	Однофакторный анализ показал, что получатель IL-10, интерлейкин-1, и интерлейкина-1 полиморфизмы RN не были связаны с наличием пневмонии (P = .589, .940, и .286, соответственно).	2	1
Pneumonia - --> IL4	CD4 производные Т-клеток, и полученные IL-4/IL-13 усиливают воспаление легких, которое происходит после повторяющейся стимуляции OVA, предполагая, что Т-клетки могут усиливать эти врожденные реакции с продолжительными осложнениями. Но врожденные клетки IL-4/IL-13 способны вызвать аллергические заболевания легких опосредуется IL-4/IL-13 с дефицитом Т-клеток.	2	2
Pneumonia - --> ADRB2	Рассмотрен полиморфизм в гене B2AR при врожденной пневмонии с началом развития сепсиса у новорожденных.	2	1
Pneumonia - --> MUC1	Вирусное поражение MAV-1 были выше в легких при дефиците Muc1-у мышей, но дефицит Muc1 оказывает минимальный эффект на MAV-1-индуцированного воспаления легких.	2	1
Pneumonia - --> CD40	Детям с мутациями CD40L или CD40 при пневмонии, вызванной P. Carinii необходима профилактика и защита от воздействия Криптоспоридий при употреблении загрязненной воды.	2	1

Как видно из таблицы наиболее релевантными оказались основные модуляторы воспалительных сигнальных путей. Как правило, это опосредованно Toll-подобными рецепторами (TLRs) и транскрипционным фактором NF-kB [157; 185]. Транскрипционный фактор NF-kB играет важную роль в регуляции целого ряда цитокинов, белков и других воспалительных медиаторов, которые играют

важную роль в элиминации патогена при пневмонии. Так, например, он регулирует экспрессию COX-2, центрального фермента синтеза простагландинов, который увеличивается в нижнем сегменте матки в конце беременности и начале родов [158]. TLRs, в свою очередь, активируются бактериальными инфекционными триггерами, которые в большинстве случаев связаны с воспалением [186].

Относительно пневмонии новорожденных нами были выбраны следующие маркеры: *TLR2*, *TLR4*, *HBD-1*, *HBD-2*, *NF-kB* и *TNF $\alpha$* , которые впоследствии были изучены с точки зрения экспрессионного профиля. Поскольку эффект активации этих рецепторов осуществлялся через транскрипционный фактор NF-kB, то его экспрессионный профиль также был интересен в работе.

Помимо прочего были выбраны дефенсины, которые играют значительную роль (как видно из Рисунка 33 и Таблицы 27) – как в качестве лигандов, так и в качестве эффекторной молекулы. Вероятно, они осуществляют дополнительную положительную регуляцию врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек.

### Роль дефенсинов в регуляции врожденного иммунитета

Роль	Тип	Смысл	MedLine ссылка
DEFB1 --+> immunoglobulin	Регуляция	Неспецифический иммуноглобулин связывается путем блокировки инкубации слайдов в течение 10 мин с 3% козьей сывороткой в Трис-фосфатном буфере в течение 20 мин перед нанесением первичных антител, т. е. anti-hBD-1 и anti-hBD-2 (BioLogo, Kronshagen, Germany).	16431059:1051
DEFB1 -- -- voltage-sensitive sodium channel complex	Привязка	Этот токсин содержит 4 дефенсин-подобный пептид, чья третичная структура напоминает бычий нейтрофил дефенсин-1, и нейротоксические активности пептида (Sh1), что связывается с напряжением тока в отсробируемые каналы натрия.	11790538:1115
TNF --+> DEFB1	Экспрессия	В отличие от hBD-1 мРНК, hBD-2 экспрессии мРНК был дополнен ЛПС и TNF.	11641058:1091
TNF --+> DEFB1	Экспрессия	Экспрессия hBD-1 была отрегулирована TNF при концентрации 100, 150 и 200 мг/мл в здоровой группе.	24370191:1058
TNF --+> DEFB1	Экспрессия	В отличие от hBD-1, в нормальных кератиноцитах значительно лучше экспрессируется hBD-2 и регулируется стимуляция TNF и некоторых видов бактерий	10465335:1067
TNF --+> DEFB1	Экспрессия	Экспрессия дефенсина 1 у собак может также активироваться TNF, поскольку значительно более	19576634:1123

		высокий уровень этого провоспалительного цитокина были найдены в повреждениях кожи собак с атопическим дерматитом.	
TNF --+> DEFB1	Экспрессия	Недавнее исследование показало, что бактериально-индуцированной дефенсин (лингвальный антимикробный пептид, DEFB1 и DEFB4) экспресирован в пупочную вену эндотелиальных клеток быков регулируется аутокринной продукции цитокина, фактора некроза опухоли- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ).	24220329:1017 7
TNF --+> DEFB1	Экспрессия	В отличие от конститутивной экспрессии hBD-1, hBD-2 и hBD-3 индуцированные интерлейкином-1, фактор некроза опухоли- $\alpha$ , гамма-интерферон вызывает бактериальное или грибковое поражение (9, 10, 11). hBD-3 является наиболее мощным дефенсином на сегодняшний день, так как он убивает Грамотрицательные и Грамположительные бактерии, вирусы и грибы. hBD-1 и hBD-2 являются менее активными пептидами и преимущественно активны в отношении грамотрицательных бактерий и дрожжей.	17074797:1050
DEFB103 В ---> DEFB1	Экспрессия	Стимуляция HBD-3 усиливает экспрессию hBD-1.	21280982:5
DEFB103 В ---> DEFB1	Экспрессия	Живая <i>T. denticola</i> существенно подавила экспрессию HBD-3, и также подавила экспрессию $\beta$ -дефенсина-1 и HBD-2.	19995893:2
DEFB1 -- -> DEFB103		Усиление активности DEFB1 влияет на экспрессию hBD-3, когда присутствует - 44G аллель (rs1800972	20100591:1021

В	Экспрессия	или 668).	
DEFB1 -- -> DEFB103 В	Экспрессия	В этой системе, hBD-1 усиливает экспрессию hBD-3, в то время как HBD-2 снижает в начале экспрессию hBD-3. Экспрессия гена hBD-1 существенно сокращается в плеоморфных аденомах слюнных желез. Предполагается, что hBD-1 может быть потенциальным супрессором опухолей.	25794853:1163
DEFB1 -- -> DEFB103 В	Экспрессия	Человеческий бета-дефенсин-1 стимулирует и усиливает бета-дефенсин-3, а HBD-2 стимулирует и уменьшает эспрессию человеческого бета-дефенсина-3.	100780843:1070
DEFB1 -- +> HSPB1	Регуляция	DEFB1 сигнализирует через TLR4 на RAC1 и оттуда в MAPKs, в конечном итоге активируется HSP27.	24457104:1163
IL1B ---> DEFB1	Экспрессия	Интересно, что индукция экспрессии гена hBD1 на IL-1 наблюдался только в MKN7 клетках.	12171956:9
IL1B ---> DEFB1	Экспрессия	hBD-1 и hBD-3 экспрессируется в эти две клетки и регулируется вниз IL-1 и усиливает экспрессию hBD-2.	23726315:8
IL1B ---> DEFB1	Экспрессия	IL1 стимулирует и активирует дифенсин - 1 и 3 у птиц, в то время как стимуляция IL6 не вызывает изменений экспрессии дефенсинов у птиц.	23625580:10
IL1B ---> DEFB1		HBD1 сообщает РНК об экспрессии в первичном амнионе эпителиальных клеток и IL-1 слегка активируются при лечении, хотя это было лишь незначительным и не может быть биологически значимыми.	17346544:1093

	Экспрессия		
IL1B ---> DEFB1	Экспрессия	Наши результаты согласуются с теми, что сообщил McDermott et al., который показал, что выражение hBD2 в человеческих эпителиальных клетках роговицы глаз, вряд ли hBD1 и hBD3, стимулирует провоспалительные цитокины, такие как IL-1beta, действуя через митоген-активируемые протеинкиназы и ядерный фактор –карра В.	16242370:1145
IL1B ---> DEFB1	Экспрессия	В отличие от конститутивной экспрессии hBD-1, hBD-2 и hBD-3 индуцированные IL-1, TNF- $\alpha$ , или $\gamma$ -интерферон экспрессируются бактериями или грибами рода Candida. hBD-3 является наиболее мощным дефенсином на сегодняшний день, так как он убивает грамотрицательные и грамположительные бактерии, вирусы и грибы. hBD-1 и hBD-2 являются менее активными пептидами и преимущественно активны в отношении грамотрицательных бактерий и дрожжей.	17074797:1050
DEFB1 -- -  TLR2	Регуляция	Экспрессия генов может быть снижена путем блокирования TLR2 и TLR4 в человеческих кератиноцитах, индуцированных $\beta$ -дифенсином 1 и IL-8 при акне.	22516809:1099
DEFB1 -- -> TLR4	Экспрессия	Например, мышинные дефенсины 1 непосредственно стимулировали TLR4 экспрессироваться в незрелых DCs и привести к созреванию этих клеток.	19042032:1019
DEFB1 -- -> TLR4		Экспрессия генов может быть снижена путем блокирования TLR2 и	22516809:1099

	Экспрессия	TLR4 в человеческих кератиноцитах, индуцированных $\beta$ -дефинсином 1 и IL-8 при акне.	
LPS --+> DEFB1	Экспрессия	С другой стороны, никакого очевидного изменения бета-дефинсина 1 при стимуляции экспрессии липополисахарида не наблюдалось.	11793193:7
LPS --+> DEFB1	Экспрессия	Внутрипротоковая инъекция липополисахарида повышает экспрессию дефинсинов-1 и -2 mRNA у крысы, которая достигла максимума за 12 часов.	25212559:4
LPS --+> DEFB1	Экспрессия	Стимуляция <i>S. aureus</i> или ЛПС - индуцированной экспрессии лингвальных антимикробных пептидов у коров дефинсина 1 (DEFB1) и дефинсина 4 у нейтрофилов коров.	23298865:2
LPS --+> DEFB1	Экспрессия	ЛПС-индуцированная экспрессия hBD1 mRNA заблокирована RVFНb2P.	21865417:1026 2
LPS --+> DEFB1	Экспрессия	В отличие от hBD-1 mRNA, hBD-2 mRNA экспрессия была дополнена ЛПС и TNF.	11641058:1091
LPS --+> DEFB1	Экспрессия	Человеческий $\beta$ дефинсин 1-3 уровня экспрессии mRNA значительно повышены в крови в ЛПС <i>Porphyromonas gingivalis</i> .	20730446:1012 6
LPS --+> DEFB1	Экспрессия	Кроме того, экспрессия птичьего дефинсин-1, -2 и -3 в курином влагалище был усилен ЛПС и <i>Salmonella enteritidis</i> .	19046776:1139
LPS --+>		Различные исследования показали,	20828865:1140

DEFB1	Экспрессия	что экспрессия hBD-1 может быть регулируется ЛПС, термически инактивированных <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , а также IFN- $\gamma$ .	
LPS --> DEFB1	Экспрессия	<i>Pseudomonas</i> и <i>Pseudomonas lipopolysaccharides</i> могут индуцировать экспрессию у крыс дефенсина-1 (также называемый трахеальный антимикробный пептид) mRNA в культивируемых эпителиальных клетках трахеи крупного рогатого скота.	12533413:1211
IFNG -- +> DEFB1	Экспрессия	В отличие от конститутивных уровней экспрессии, IFN $\gamma$ -индуцированные кератиноциты hBD1 и hBD3 экспрессия mRNA был значительно выше в клетках с общим генотипом CC, но нет четкой корреляции генотипа с экспрессией hBD2.	19712472:8
IFNG -- +> DEFB1	Экспрессия	IFN- косвенно регулирует экспрессию дефенсин-1 у мышей при инфекции в естественных условиях.	15102787:1156
IFNG -- +> DEFB1	Экспрессия	hBD1 является конститутивным в различных тканях и может быть модулированы ЛПС <i>Pseudomonas aeruginosa</i> $\gamma$ - interferon.	22250708:1007 2
IFNG -- +> DEFB1	Экспрессия	hBD-1 обнаруживается в моноцитах, зрелые MDDC, и PDC и может быть регулируемым в моноцитах на IFN- $\gamma$ и/или LPS [8 -10].	21551252:1002 5
IFNG -- +> DEFB1	Экспрессия	Различные исследования показали, что экспрессия hBD-1 может быть регулируется ЛПС, термически инактивированных <i>Pseudomonas aeruginosa</i> и IFN- $\gamma$ .	20828865:1140
DEFB1 -- +> IL6	Регуляция	Индукция IL-6 и IL-10 на hBD-1 была также очевидна, но в меньшей	16569862:1141

		степени, чем наблюдалось в ответ на hBD-2.	
DEFB1 -- +> IL6	Регуляция	Экспрессии hBD1, hBD2, hBD3 и CAP18 mRNA у человека в десневых эпителиальных клетках, стимулирует IL-1, IL-6, IL-8 и TNF- $\gamma$ .	16926414:1176
DEFB1 -- +> CXCL8	Регуляция	Экспрессия hBD1, hBD2, hBD3 и CAP18 mRNA у человека в десневых эпителиальных клетках, стимулирует IL-1, IL-6, IL-8 и TNF- $\gamma$ .	16926414:1176
DEFB1 -- +> CXCL8	Регуляция	Кроме того, было понятно, что hBD-2 усиливает моноцитарный хемоаттрактантный протеин 1 (MCP-1) и умеренно регулируется MIP-1. hBD-2 также индуцировали выработку RANTES, IL-1, ENA-78 и GRO. hBD-1 регулируется или индуцируется IL-8, MIP-1 и MCP-1 а также низкий уровень IGFBR-3 и EGF.	16569862:1140
DEFB1 -- +> IL10	Регуляция	hBD1 индуцировалась существенно выше ( $p < 0,05$ ) овальбумин-специфических сывороточных IgG, выше, но не значительно, сывороточного IgM, и достоверно выше ( $p < 0,05$ ) IL -10.	12654098:8
DEFB1 -- +> IL10	Регуляция	Индукция IL-6 и IL-10 на hBD-1 был также очевидна, но в меньшей степени, чем наблюдалось в ответ на hBD-2.	16569862:1141
farnesol -- +> DEFB1	Экспрессия	Это исследование подтверждает, что фарнезол способствует производству эпителиальными клетками hBD1 и hBD2.	19121950:1190
exotoxin - --  DEFB1	Экспрессия	Например, экзотоксины <i>V. cholerae</i> и энтеротоксигены <i>E. coli</i> , имеют, как сообщается, низкую регуляцию	25936225:1157

		экспрессии кателицидина человека и бета-дефенсин-1 <i>in vitro</i> .	
exotoxin - --  DEFB1	Экспрессия	Наблюдается низкая регуляция бактериальных экзотоксинов кателицидина (протокол hCAP-18/LL-37) и экспрессию бета-дефенсин 1 в эпителиоцитах кишечника человека.	18717821:100
exotoxin - --  DEFB1	Экспрессия	Наблюдается низкая регуляция бактериальных экзотоксинов кателицидина (протокол hCAP-18/LL-37) и экспрессию бета-дефенсин 1 в эпителиоцитах кишечника человека.	24006470:22320
exotoxin - --  DEFB1	Экспрессия	Наблюдается низкая регуляция бактериальных экзотоксинов кателицидина (протокол hCAP-18/LL-37) и экспрессию бета-дефенсин 1 в эпителиоцитах кишечника человека.	23968350:10265
staphylococcal enterotoxin B ---  DEFB1	Экспрессия	Повышение концентрации стафилококкового энтеротоксина В приводит к низкой регуляции DEFA5, DEFA6 и DEFB1 mRNA в доз-зависимом образе, но одновременно увеличилась регуляция DEFB2.	19386083:5
DEFB1 -- +> TLR4	Экспрессия	Например, $\beta$ -дефенсины 1 у мышей непосредственно стимулировали TLR4 экспрессированные в незрелых DCs и привели к созреванию этих клеток.	100768025:1019
DEFB1 -- +> TLR4	Экспрессия	Экспрессия генов может быть снижена путем блокировки TLR2 и TLR4 в человеческих кератиноцитах, индуцированных $\beta$ -дифенсином 1 и IL-8 при акне.	101694425:1099

Как видно из таблицы, *TLR4*, *TLR2* и *TNF $\alpha$*  имели прочную ассоциацию с развитием пневмонии.

В целом можно отметить, что используемый нами биоинформационный подход позволили определить круг наиболее значимых сигнальных каскадов, которые активируются при пневмонии новорожденных. Кроме того, возможность регуляции экспрессии и активности большинства, представленных цитокинов, позволяет рассматривать их как потенциальные терапевтические мишени для биоинженерных препаратов.

## **7.2. Оценка факторов врожденного иммунитета в клетках слизистой респираторного тракта здоровых новорожденных**

Несмотря на важную роль слизистой респираторного тракта в иммунной защите, на данный момент практически отсутствуют работы, посвященные изучению экспрессии факторов врожденного иммунитета в эпителиальных клетках слизистой респираторного тракта новорожденных. В связи с этим в настоящем разделе проведено сравнительное исследование экспрессии факторов врожденного иммунитета: *TLR2*, *TLR4*, *HBD-1*, *HBD-2*, *NF- $\kappa$ B* и *TNF $\alpha$* .

Данные факторы были выбраны не случайно. Во-первых, вышепредставленные маркеры были «отобраны» посредством биоинформационного анализа, представленного в предыдущей главе. Во-вторых, среди них прослеживается сигнальный каскад, который может активироваться в результате воздействия инфекционного агента: непосредственно рецепторы, вторичный месенджер и эффекторные молекулы. Так, в работе исследовали экспрессию генов *TLR2* и *TLR4*, участвующих в распознавании большинства бактерий, с которыми «сталкивается» иммунная система в первые дни жизни ребенка. Также провели оценку экспрессии гена транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B, который активирует экспрессию генов эффекторных молекул врожденного иммунитета. Эти факторы, в свою очередь, приводят к развитию воспалительных реакций в ответ на проникновение патогена.

Другие молекулы, исследуемые в работе: цитокин *TNF $\alpha$*  и противомикробные пептиды *HBD-1* и *HBD-2*. *TNF $\alpha$*  это противовоспалительный цитокин, который участвует в развитии воспаления при проникновении патогена. *HBD-1* и *HBD-2* – противомикробные пептиды, которые относятся к дефенсинам, причем *HBD-1* экспрессируется конститутивно и его уровень часто генетически-опосредован, а *HBD-2* является индуцибельным пептидом.

Нами было показано, что в эпителиальных клетках верхних отделах респираторного тракта здоровых новорожденных экспрессируются *TLRs*. В группе здоровых новорожденных в эпителиальных клетках слизистой респираторного тракта уровень экспрессии генов *TLR2* составил –  $149,7 \times 10^3$  копий исследуемого гена относительно экспрессии гена актина, *TLR4* –  $0,8 \times 10^3$  копий исследуемого гена относительно экспрессии гена актина.

Экспрессия *TLR2* была сопоставима с показателями у детей других возрастных категорий, в то время как показатель *TLR4* – был достоверно выше на порядок [23; 25]. Это можно объяснить тем, что здоровые новорожденные до рождения не контактируют с инфекционными агентами. После родов резко увеличивается инфекционная нагрузка, что может быть ассоциировано с повышенной экспрессией рецепторов врожденного иммунитета.

В подтверждение данной теории можно представить данные по экспрессии рецепторов *TLR2* и *TLR4* у здоровых новорожденных, у которых определены в верхних дыхательных путях возбудители (*E.coli*, *Acinetobacter*, *P.aeruginosa*, *Citribacter* и др.).

При этом следует отметить, что инфекционной патологии (пневмонии и др.) у этих новорожденных не было выявлено. В группе здоровых новорожденных с возбудителями в эпителиальных клетках слизистой респираторного тракта уровень экспрессии генов *TLR2* составил –  $379,9 \times 10^3$  копий исследуемого гена относительно экспрессии гена актина, *TLR4* –  $0,6 \times 10^3$  копий исследуемого гена относительно экспрессии гена актина.

Таким образом, мы можем говорить о достоверном увеличении показателя *TLR2* в 2,53 раза относительно такового в группе здоровых новорожденных, у

которых инфекции не выявлялись. Активация рецепторов врожденного иммунитета может приводить к запуску сигнального пути через *NfκB* и к выработке противомикробных пептидов (*HBD-2* и др.) и провоспалительных цитокинов (к примеру, *TNFα* и др.).

Уровень экспрессии ядерного фактора *NfκB* в группе здоровых новорожденных составил  $5,17 \times 10^3$  копий исследуемого гена относительно экспрессии гена актина, а в группе новорожденных с детектируемым инфекционным возбудителем (без патологии) –  $10,86 \times 10^3$  копий исследуемого гена относительно экспрессии гена актина, что в 2,1 раза выше, чем в группе сравнения. Данный показатель может свидетельствовать об активации классического сигнального пути с рецепторов *TLR*.

Известно, что экспрессия β-дефенсинов в респираторном тракте приобретает особое значение у новорожденных, так как эти пептиды способствуют защите плода от инфекции. В ряде работ показано, что *TLR* индуцирует экспрессию дефенсинов эпителиальными клетками многих тканей [85].

Имеются единичные работы по экспрессии гена *HBD-1* и *HBD-2* в респираторном тракте у детей [5].

В связи с этим, одной из задач работы явилось изучение экспрессии генов *HBD-1* и *HBD-2* в эпителиальных клетках слизистой верхних отделов респираторного тракта у здоровых новорожденных.

Были определены фоновые показатели экспрессии генов *HBD-1* и *HBD-2*, которые составили 7,6 и 39,7 ( $\times 10^3$  копий исследуемого гена относительно экспрессии гена актина), соответственно.

В группе здоровых новорожденных с выявленным патогеном данные показатели были значительно выше и составили 14,9 и 182,2 ( $\times 10^3$  копий исследуемого гена относительно экспрессии гена актина), соответственно. Можно утверждать, что наличие патогена в респираторном тракте у новорожденных ведет к активации экспрессии противомикробных пептидов: *HBD-1* – в 1,9 раз и *HBD-2* – в 4,6 раз.

При этом уровень эффекторной молекулы *TNF $\alpha$*  также возрастал в 2,3 раза. Данные представлены в Таблице 32.

Суммируя полученные данные можно заключить, что в эпителиальных клетках респираторного тракта здоровых новорожденных на фоновом уровне экспрессируются исследуемые показатели врожденного иммунитета, а наличие патогена в большинстве случаев приводит к активации экспрессии этих факторов. Механизмы активации связаны с взаимодействием лигандов (компонентов патогенов) с *TLRs*. В случае если врожденный иммунитет на уровне слизистой оболочки респираторного тракта новорожденного адекватно реагирует на патоген, в таком случае, не наблюдается какого-то патологического процесса. В следующем разделе работы будут представлены данные о том, как меняется экспрессионный профиль молекул врожденного иммунитета при внутриутробном инфицировании плода и внутриутробной пневмонией.

### **7.3. Изменение показателей врожденного иммунитета у новорожденных с внутриутробными и ранними неонатальными пневмониями**

В работе неоднократно говорилось о том, что патология дыхательной системы новорожденных является одной из самых распространенных причин детской смертности. [M.J. Fayon et al., 1999] показал, что к основным факторам риска развития пневмонии у детей, находящихся на ИВЛ, является инфекция. Также было высказано предположение, что среди факторов, которые могут привести к развитию пневмонии немаловажное значение играет иммунодефицитное состояние [156]. В связи с этим, на следующем этапе работы нами было проведено исследование экспрессии факторов врожденного иммунитета клетками слизистой респираторного тракта новорожденных с пневмонией. Среди обследованных пациентов было выделено две группы: новорожденные с внутриутробной пневмонией и новорожденные с ранней неонатальной пневмонией. Группу сравнения составили здоровые новорожденные, у которых не было инфекционных и другого рода патологий.

Полученные результаты представлены в Таблице 28.

Таблица 28

**Показатели экспрессии генов врожденного иммунитета в эпителиальных клетках верхних дыхательных путей у новорожденных с ВУП и РНП**

Исследуемая группа		Группа сравнения 1 (здоровые новорожденные) $\times 10^3$	Группа сравнения 2 (здоровые новорожденные с инф.) $\times 10^3$	Группа новорожденных с ВУП $\times 10^3$	Группа новорожденных с РНП $\times 10^3$
Экспрессия гена <i>TLR2</i>	Количество копий относит экспрессии гена актина*	149,66 (64,9 - 428,8)	<b>379,86 #</b> (225,3 - 2872,5)	110,096 (72,14 - 140,0)	98,502 (57,02 - 160,25)
	Отношение показателя в норме к показателю при патологии**	1	<b>2,538</b>	-1,359	-1,519
Экспрессия гена <i>TLR4</i>	*	0,796 (0,54-1,08)	0,604 (0,48-0,69)	<b>0,354 #</b> (0,31-0,37)	0,453 (0,28-0,60)
	**	1	-1,3180	<b>-2,248</b>	-1,757
Экспрессия гена <i>HBD-1</i>	*	7,602 (6,47-12,59)	<b>14,975 #</b> (10,86-17,08)	7,44 (7,07-15,95)	7,148 (5,25-9,29)
	**	1	<b>1,970</b>	-1,021	-1,063
Экспрессия гена <i>HBD-2</i>	*	39,746 (22,85-87,41)	<b>182,17 #</b> (101,91-32,98)	41,126 (22,39-67,14)	41,469 (22,30-69,62)
	**	1	<b>4,583#</b>	<b>1,035</b>	1,043
Экспрессия гена <i>TNF<math>\alpha</math></i>	*	2,19 (1,78-5,88)	5,05 (3,56-11,76)	<b>13,32#</b> (3,04-23,12)	<b>10,04#</b> (7,07 -16,95)
	**	1	<b>2,3</b>	<b>6,069#</b>	<b>4,577#</b>
Экспрессия гена <i>NF-<math>\kappa</math>B</i>	*	5,17 (3,35-11,76)	10,86 (6,71-23,52)	<b>21,84#</b> (6,94-38,09)	<b>13,42#</b> (15,24-38,94)
	**	1	<b>2,1</b>	<b>4,222#</b>	<b>2,594#</b>

Примечание - «#» – показатель достоверно отличается от контрольного значения ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, у новорожденных с ВУП выявлено умеренное снижение показателя *TLR2* и резкое угнетение экспрессии гена *TLR4* в 2,24 раза. Показатели дефенсинов при этом практически не отличались от нормы.

У пациентов с РНП также наблюдалось небольшое снижение экспрессии гена *TLR2* в 1,5 раз и *TLR4* – в 1,75 раз. При этом у новорожденных с пневмонией наблюдался четкий рост уровня экспрессии гена провоспалительного цитокина  $TNF\alpha$  и ядерного фактора *NF-kB*, что может свидетельствовать об активации воспалительных реакций на уровне слизистых оболочек. Следует отметить, что данная активация происходит на фоне супрессии экспрессии генов рецепторов. Далее нами был проведен корреляционный анализ полученных результатов представленных в Таблице 29.

**Изучение корреляционной зависимости между уровнем экспрессии исследуемых показателей врожденного иммунитета в эпителиальных клетках слизистой верхних дыхательных путей у новорожденных (коэффициент корреляции по Спирмену)**

<b>Здоровые новорожденные</b>						
	TLR2	TLR4	HBD-1	HBD-2	TNF $\alpha$	NF-kB
<i>TLR2</i>		rs = 0.101	<b>rs = 0,734</b>	<b>rs = 0,781</b>	rs = 0.543	rs = 0.54
<i>TLR4</i>	rs = 0.101		rs = 0.388	rs = 0.248	rs = 0.543	rs = 0.541
<i>HBD-1</i>	<b>rs = 0,734</b>	rs = 0.388		<b>rs = 0,734</b>	rs = -0.371	rs = -0.37
<i>HBD-2</i>	<b>rs = 0,781</b>	rs = 0.248	<b>rs = 0,734</b>		rs = 0.543	rs = 0.54
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	rs = 0.543	rs = 0.543	rs = -0.371	rs = 0.543		<b>rs = 0,96</b>
<i>NF-kB</i>	rs = 0.54	rs = 0.541	rs = -0.37	rs = 0.54	<b>r<sub>s</sub> = 0,96</b>	
<b>Новорожденные с ВУП</b>						
	TLR2	TLR4	HBD-1	HBD-2	TNF $\alpha$	NF-kB
<i>TLR2</i>		rs = -0.1	<b>rs = 0,833</b>	<b>rs = 0,983</b>	rs = -0.429	rs = -0.238
<i>TLR4</i>	rs = -0.1		rs = -0.117	rs = -0.2	rs = 0.452	<b>rs = 0,667</b>
<i>HBD-1</i>	<b>rs = 0,833</b>	rs = -0.117		<b>rs = 0,85</b>	rs = -0.143	rs = 0.
<i>HBD-2</i>	<b>rs = 0,983</b>	rs = -0.2	<b>rs = 0,85</b>		rs = -0.381	rs = -0.286
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	rs = -0.429	rs = 0.452	rs = -0.143	rs = -0.381		<b>rs = 0,833</b>
<i>NF-kB</i>	rs = -0.238	<b>rs = 0,667</b>	rs = 0.	rs = -0.286	<b>rs = 0,833</b>	
<b>Новорожденные с РНП</b>						
	TLR2	TLR4	HBD-1	HBD-2	TNF $\alpha$	NF-kB
<i>TLR2</i>		rs = -0.251	rs = 0.368	<b>rs = 0,918</b>	r <sub>s</sub> = 0.051	r <sub>s</sub> = 0.142
<i>TLR4</i>	rs = -0.251		rs = 0.274	rs = -0.323	r <sub>s</sub> = 0.188	r <sub>s</sub> = -0.032
<i>HBD-1</i>	rs = 0.368	rs = 0.274		rs = 0.308	r <sub>s</sub> = -0.072	r <sub>s</sub> = -0.115
<i>HBD-2</i>	<b>rs = 0,918</b>	rs = -0.323	rs = 0.308		r <sub>s</sub> = -0.024	r <sub>s</sub> = 0.136
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	r <sub>s</sub> = 0.051	r <sub>s</sub> = 0.188	r <sub>s</sub> = -0.072	r <sub>s</sub> = -0.024		<b>r<sub>s</sub> = 0,863</b>
<i>NF-kB</i>	r <sub>s</sub> = 0.142	r <sub>s</sub> = -0.032	r <sub>s</sub> = -0.115	r <sub>s</sub> = 0.136	<b>r<sub>s</sub> = 0,863</b>	

Как видно из таблицы в группе здоровых новорожденных выявлена положительная ассоциация экспрессии *TLR2* и *HBD-1*, *TLR2* и *HBD-2*, *HBD-1* и *HBD-2* (при этом коэффициент составил 0,734, 0,734, 0,781, соответственно).

В группе новорожденных с ВУП была определена аналогичная зависимость. А в группе с РНП корреляция показателей была иной - *HBD-1* и *HBD-2* (коэффициент 0,918). Также была найдена слабая обратная зависимость между *TLR4* и *HBD-2*.

На следующем этапе работы мы провели исследование изменения экспрессионных профилей молекул врожденного иммунитета относительно этиологического фактора (возбудителя).

#### **7.4. Изменение показателей врожденного иммунитета у новорожденных с пневмонией в зависимости от этиологии возбудителя**

Нами проведено изучение микробиоты и факторов врожденного иммунитета (*TLR2*, *TLR4*, *HBD-1*, *HBD-2*, *TNF $\alpha$*  и *NF- $\kappa$ B*) на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей при внутриутробном инфицировании плода и пневмонии новорожденных.

У большинства новорожденных были выделены грамотрицательные микроорганизмы (93%), среди которых преобладали энтеробактерии (79%). Энтеробактерии чаще всего были представлены *K.pneumonia* (33%), *E.coli* (24%) и *P.aeruginisa* (22%). Грамположительные возбудители были представлены коагулазоотрицательными стафилококками, среди которых преобладали *S.epidermidis*, обладающие гемолитическими свойствами (26%).

При затяжном течении пневмоний у новорожденных основным возбудителем являлся *St. maltophilia*.

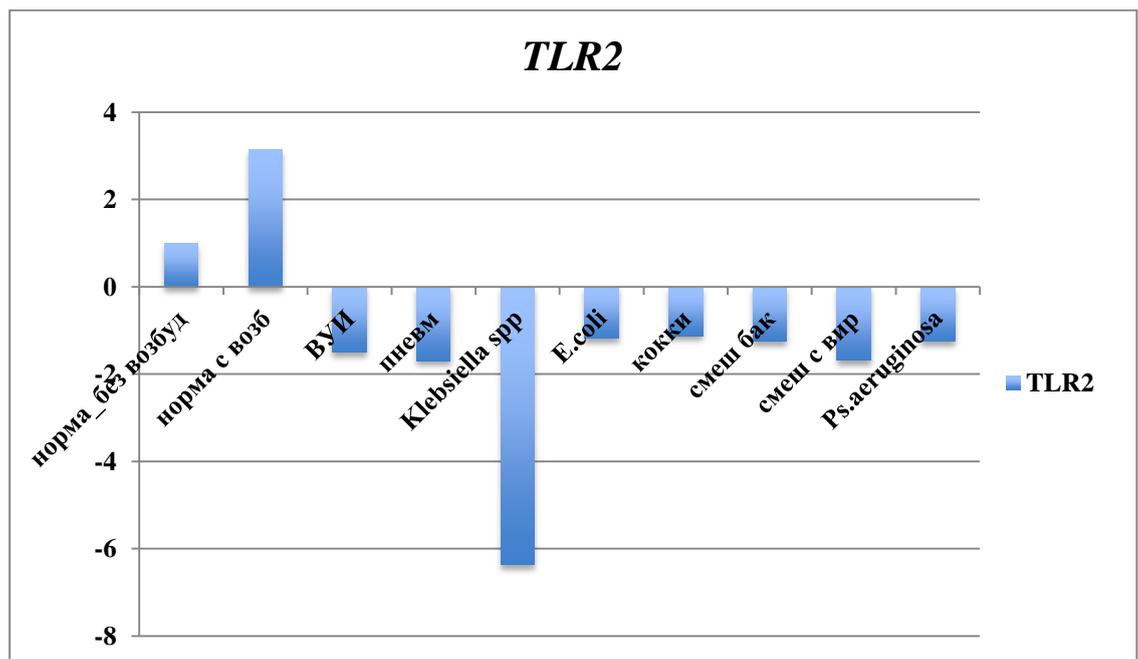
Показатели врожденного иммунитета – Toll подобные рецепторы (*TLR2*, *TLR4*) – экспрессировались на эпителиальных клетках верхних дыхательных путей как у новорожденных с ВУП, так и у детей с РНП. Следует отметить, что у новорожденных с ВУП уровни экспрессии распознающих структур были

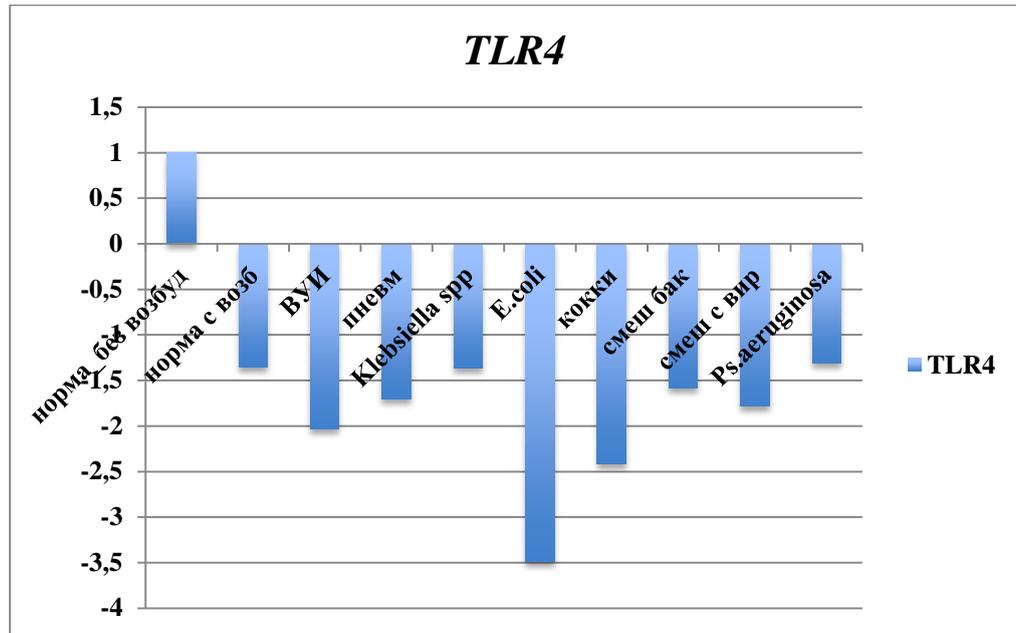
достоверно снижены в два раза, этот факт можно объяснить как генетическими особенностями организма ребенка, так и активностью факторов патогенности микроорганизмов.

Для подтверждения последней гипотезы был проведен анализ ассоциации показателей врожденного иммунитета и наличием определенного возбудителя. Были выделены подгруппы детей с пневмониями, вызванными *K.pneumonia*, *P.aeruginosa*, *E.coli*, кокковой флорой и смешанной инфекцией.

Показано, что экспрессия гена TLR2 снижалась в 6,2 раза у пациентов с *K.pneumonia* и в два раза и более при смешанной инфекции. Уровни экспрессии гена *TLR4* были снижены более чем в три раза при инфекции, вызванной *E.coli*.

Данные экспрессии генов *TLR2* и *TLR4* представлены на Рисунке 33.





*Примечание* - По оси абсцисс – исследуемые группы. По оси ординат – относительные единицы показателя экспрессии (показатель в опытной группе относительно показателя в группе сравнения).

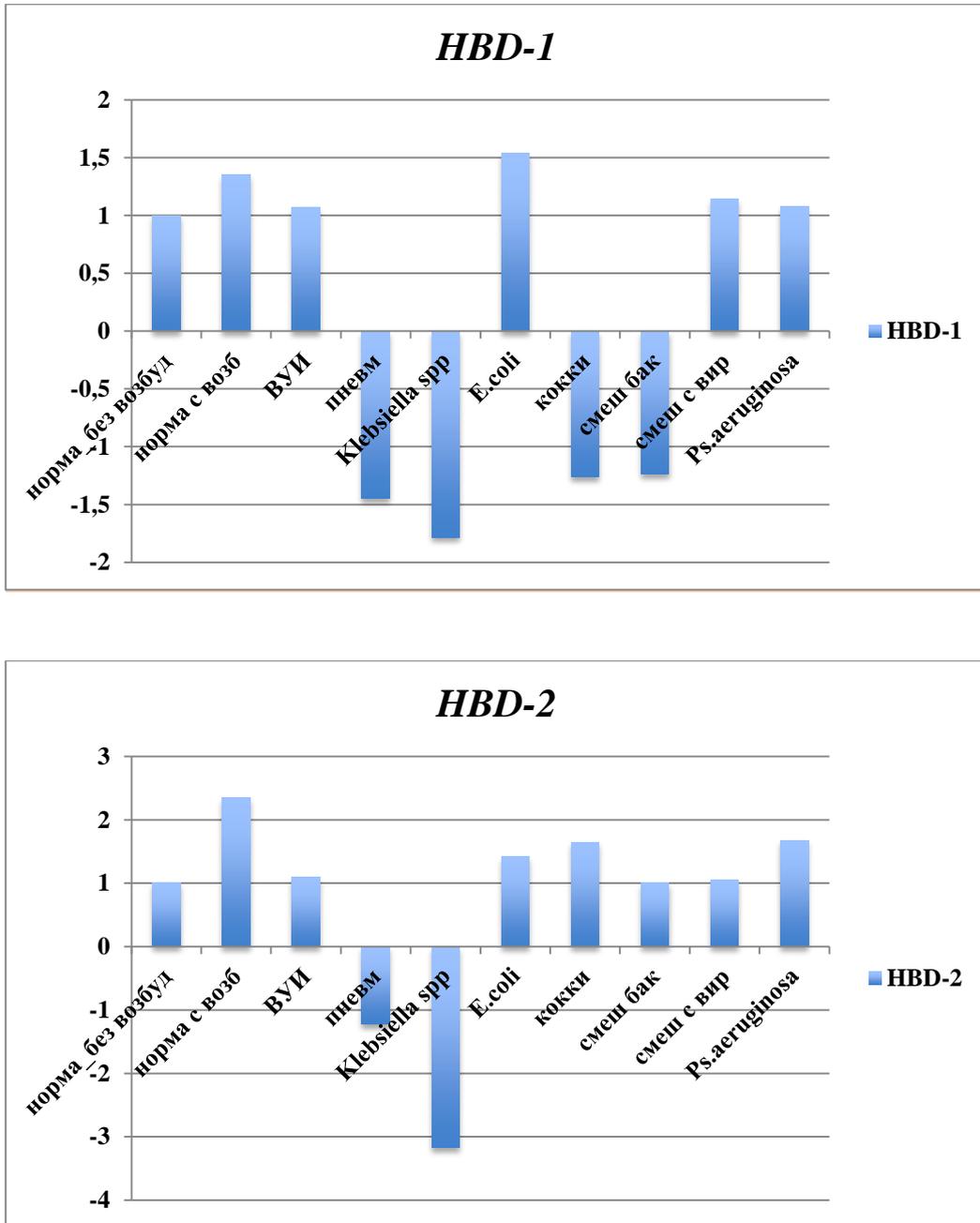
**Рис. 33 Экспрессия генов *TLR2* и *TLR4* в эпителиальных клетках верхних дыхательных путей новорожденных с ВУП и РНП**

На следующем этапе были определены уровни экспрессии генов *HBD-1* и *HBD-2* в эпителиальных клетках верхних дыхательных путей в группах новорожденных с ВУП, с РНП и у здоровых детей.

Известно, что дефенсины осуществляют защиту слизистых от инфекционных возбудителей. *HBD-1* постоянно вырабатывается на уровне слизистой верхних дыхательных путей, а *HBD-2* – индуцибельно, т.е. под действием инфекционных патогенов.

Показано, что экспрессия гена *HBD-2* увеличивается в 2,3 раза у новорожденных, у которых определяется инфекционный возбудитель, но при этом отсутствуют клинические проявления пневмонии. Также показано достоверное снижение показателя *HBD-2* (в 3,2 раза) у пациентов с пневмонией, вызванной *K. pneumoniae*.

Данные экспрессии генов *HBD-1* и *HBD-2* показаны на Рисунке 34.



*Примечание.* По оси абсцисс – исследуемые группы. По оси ординат – относительные единицы показателя экспрессии (показатель в опытной группе относительно показателя в группе сравнения).

Рис. 34 Экспрессия генов *HBD-1* и *HBD-2* в эпителиальных клетках верхних дыхательных путей новорожденных с ВУП и РНП

Как видно из рисунка показатели *HBD-1* во всех исследуемых группах менялись недостоверно.

Помимо дефенсинов, был проведен анализ экспрессии генов провоспалительного цитокина *TNF $\alpha$*  и фактора транскрипции *NF-kB* в эпителиальных клетках верхних дыхательных путей в исследуемых группах. Данные молекулы участвуют в сигнальном пути с *TLRs*. Так, было показано, что у детей, у которых выявляли инфекционные возбудители, но не было клинических проявлений, показатель цитокина возрастал более чем в два раза.

Это можно объяснить тем, что инфекционные возбудители через *TLR* активируют выработку провоспалительного цитокина *TNF $\alpha$* .

В группах с внутриутробным инфицированием, с пневмонией новорожденных, вызванной *E. coli*, *P.aeruginosa*, кокками и при смешанной инфекции показатель *TNF $\alpha$*  возрастал в 3-4 раза относительно показателя в группе сравнения. Уровень экспрессии гена *NF-kB* достоверно увеличивался только в группах пациентов с внутриутробным инфицированием плода (в 2,5 раза) и у новорожденных с пневмонией, вызванной кокковой микрофлорой (в 3,1 раз).

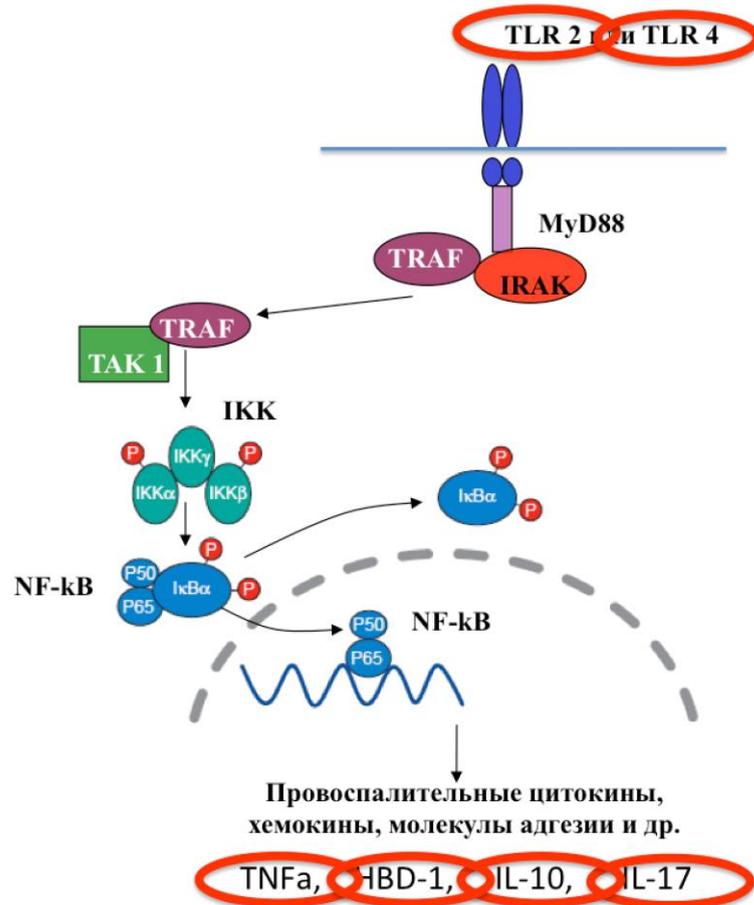
Иммунологические показатели (распознающие структуры – *TLR2*, *TLR4*, дефенсины *HBD-1*, *HBD-2*, провоспалительный цитокин *TNF $\alpha$*  и фактор транскрипции *NF-kB*) у новорожденных с внутриутробным инфицированием и с пневмонией изменяются неоднозначно. Выявлена тенденция к снижению экспрессии генов *TLR2*, *TLR4* и увеличению экспрессии генов *TNF $\alpha$*  и *NF-kB*. Данные изменения коррелируют с инфекционным возбудителем, следовательно, можно предположить, что непосредственно возбудитель за счет действия факторов патогенности влияет на показатели врожденного иммунитета.

## ГЛАВА 8. ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ В ГЕНАХ *TLRS*, *DEFB1* И ЦИТОКИНОВ У НОВОРОЖДЕННЫХ С НЕОНАТАЛЬНЫМИ ПНЕВМОНИЯМИ

В предыдущих разделах были представлены результаты о том, что дисбаланс в системе *TLRs* приводит к развитию внутриутробному инфицированию плода. В результате изменений в экспрессии генов врожденного иммунитета происходит неадекватное развитие механизмов врожденного иммунитета, что может быть причиной патологии, и даже привести к летальному исходу. В настоящее время существует подход, который может позволить отчасти объяснить причину нарушений – генетическая предрасположенность.

Известно, что нарушения на уровне генов могут приводить как к нарушению белковой последовательности, так и к нарушению регуляции экспрессии гена. Значение генетических факторов в патологии беременных и новорожденных в настоящее время общепризнанно [167; 198].

В последнее время доказана роль наследственных факторов в интенсивности реализации механизмов врожденного иммунитета. Генетическая предрасположенность к развитию ВУП и РНП связана с наследованием определенных аллелей и генотипов. В данной работе мы выбрали ряд факторов врожденного иммунитета, которые по данным биоинформационного анализа и по результатам экспрессионного профиля имеют большое значение в защите организма при ВУП/РНП. Данные факторы представлены на Рисунке 35. Все они являются компонентами *TLR*-опосредованного пути.



*Примечание.* Красным цветом выделены факторы, исследуемые в работе (на генетическом уровне)

Рис. 35 Схематичное изображение *TLR*-опосредованного пути

В данном разделе представлены данные по изучению ассоциации пневмонии у новорожденных (РНП и ВУП) с полиморфными маркерами в таких генах – кандидатах, как *TLR2*, *TLR4*, *DEFB1*, *IL-10*, *IL-17* и *TNFα*.

В наших исследованиях представлены результаты по ассоциации полиморфных маркеров в генах *TLR2* и *TLR4* с патологическими состояниями инфекционного генеза. Данные рецепторы представляют интерес в связи с тем, что они распознают широкий спектр патогенов, которые могут вызывать ВУП и/или РНП, и, следовательно, нарушение в белковой последовательности этих рецепторов может напрямую быть связано с их функцией.

Другой полиморфный маркер, исследуемый в работе, локализуется в нетранслируемой 5'-области гена *DEFB1* (кодирующего белок  $\beta$ -дефенсин-1 человека). И изменения его состояния могут напрямую влиять на количество экспрессируемого белка. Таким образом, можно говорить о генетически-опосредованной регуляции количества дефенсина на уровне слизистых оболочек.

Также нами были исследованы полиморфизмы в генах как про-, так и противовоспалительных цитокинов. Исследования последнего десятилетия показали, что маркеры пневмонии могут быть связаны с генами цитокинов [188; 198]. Во-первых, доказан факт участия цитокинов в защитных механизмах против возбудителей пневмонии. Во-вторых, выявлен полиморфизм цитокиновых генов, как в области экзонов, кодирующих функциональную область молекулы, так и в интронах, влияющих на эффективность экспрессии цитокина.

Таким образом, активность и количество одного и того же цитокина могут быть различными в зависимости от генетических вариаций. На сегодняшний день существует ряд работ о корреляции полиморфизма генов провоспалительных цитокинов с развитием патологии новорожденных и плода. Представляет особый интерес и ряд предварительных клинических исследований, касающихся возможных связей между генотипом цитокинов и развитием инфекций. В целом, для определения роли полиморфизма генов цитокинов и других регуляторных молекул (Toll-подобных рецепторов, дефенсинов и др.) требуются дальнейшие исследования.

### **8.1. Исследование ассоциации полиморфных маркеров в генах**

#### ***TLR2* и *TLR4* у родильниц новорожденных с РНП и ВУП**

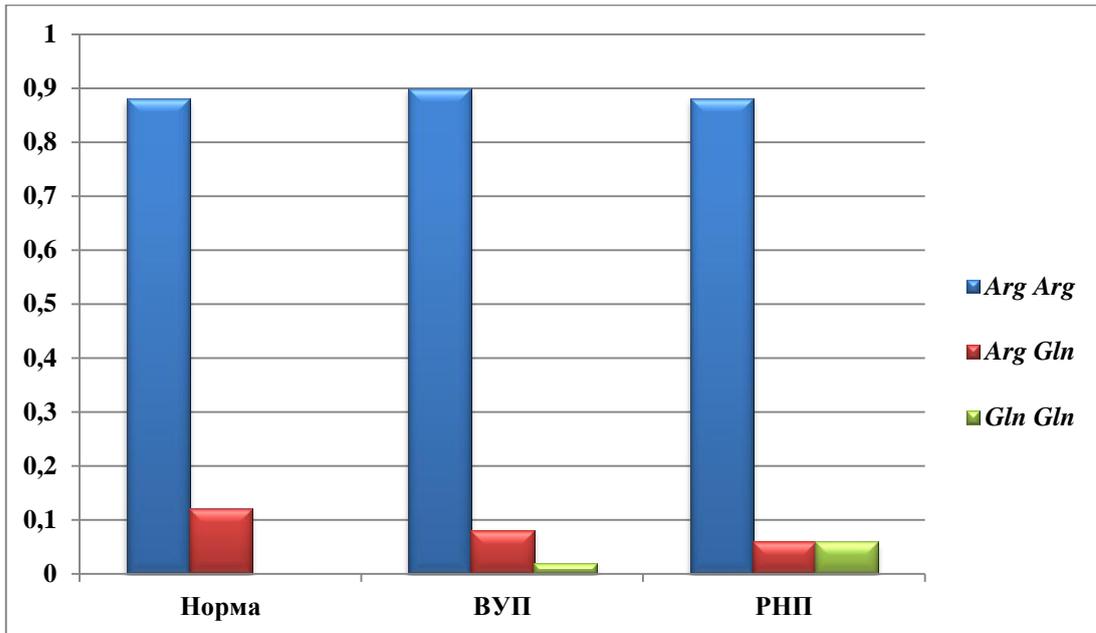
При изучении распределения аллелей и генотипов полиморфного маркера Arg753Gln гена *TLR2* среди родильниц, у которых родились дети с ВУП и РНП, а также в группе родильниц с физиологически протекавшей беременностью и без патологии плода обнаружено преобладание частоты аллеля Arg над частотой

аллеля *Gln*, данные представлены в Таблице 30, и встречаемости генотипа *ArgArg* над встречаемостью генотипов *ArgGln* и *GlnGln* во всех исследуемых группах (у родильниц), представлены на Рисунке 36 А. Отличия распределения аллелей и генотипов между группами были недостоверны.

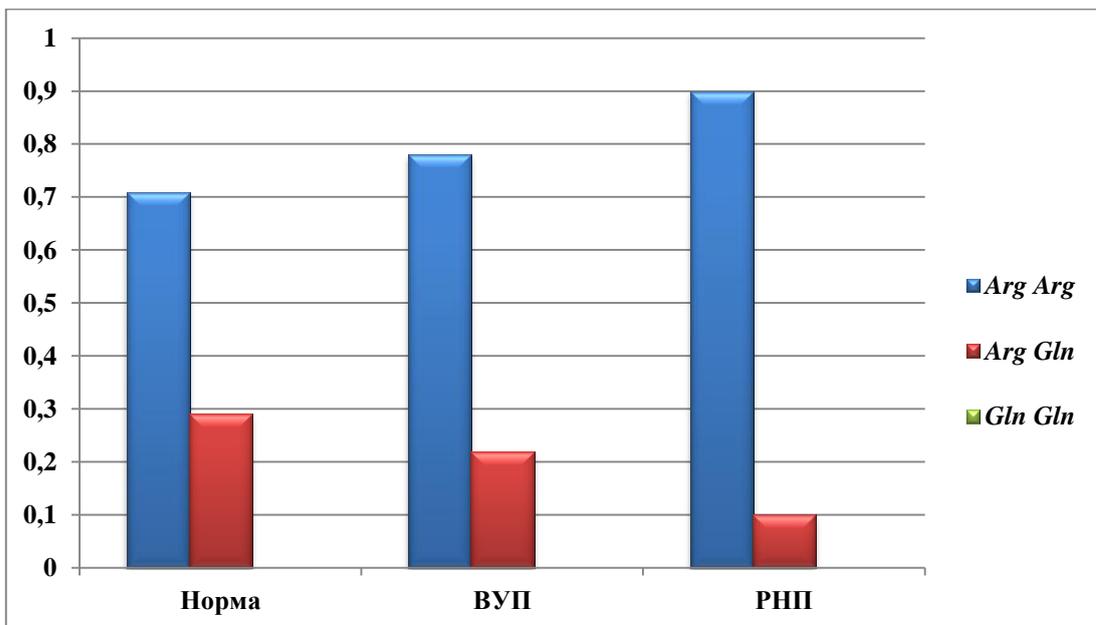
В нашей работе также исследовалось распределение аллелей и генотипов полиморфного маркера *Arg753Gln* гена *TLR2* у новорожденных с ВУП и РНП. Полученные данные, представленные на Рисунке 36 Б, не сильно отличались от данных родильниц. Частота аллеля *Arg* была значительно выше аллеля *Gln* и варьировала в диапазоне 0,86 - 0,95 (частота аллеля *Gln* варьировала в диапазоне 0,05 - 0,14). Следует отметить, что частота гетерозиготного генотипа была выше, чем в аналогичной группе родильниц. А генотип *GlnGln* отсутствовал в исследуемых нами группах новорожденных.

Распределение аллелей и генотипов маркеров *Arg753Gln* гена *TLR2* и *Asp299Gly* гена *TLR4* родильниц и новорожденных в группах с ВУП, с РНП и в группе сравнения

<i>Arg753Gln</i> гена <i>TLR2</i>							
родильницы	<i>Arg</i>	<i>Gln</i>	<i>p</i>	<i>Arg Arg</i>	<i>Arg Gln</i>	<i>Gln Gln</i>	<i>p</i>
Норма	0,94	0,06	-	0,88	0,12	0	-
ВУП	0,94	0,06	≥0,05	0,90	0,08	0,02	≥0,05
РНП	0,91	0,09	≥0,05	0,88	0,06	0,06	≥0,05
<i>Asp299Gly TLR4</i>							
родильницы	<i>Asp</i>	<i>Gly</i>	<i>p</i>	<i>AspAsp</i>	<i>AspGly</i>	<i>GlyGly</i>	<i>p</i>
Норма	0,98	0,02	-	0,96	0,04	0	-
ВУП	0,89	0,11	<0,05	0,86	0,05	0,09	<0,05
РНП	0,97	0,03	≥0,05	0,96	0,04	0	≥0,05
<i>Asp299Gly TLR4</i>							
новорожденные	<i>Asp</i>	<i>Gly</i>	<i>p</i>	<i>AspAsp</i>	<i>AspGly</i>	<i>GlyGly</i>	<i>p</i>
Норма	1	0	-	1	0	0	-
ВУП	0,92	0,08	<0,05	0,83	0,17	0	<0,05
РНП	1	0	≥0,05	1	0	0	≥0,05



А



Б

*Примечание.* По оси абсцисс – исследуемые группы, по оси ординат – частота встречаемости генотипа

Рис. 36 Распределение генотипов *Arg753Gln* гена *TLR2* у родильниц (А) и новорожденных (Б) в группах с ВУП, с РНП и в группе сравнения

Таким образом, можно заключить, что полиморфный маркер *Arg753Gln* гена *TLR2* не связан с внутриутробным инфицированием плода, а также с пневмонией новорожденных. Можно предположить, хотя замена аминокислоты в 753 положении могла привести к изменению передачи сигнала с TIR-домена *TLR2* рецептора, но в наших исследованиях это изменение не было критично для реализации патологии новорожденных. Следует отметить, что в русской популяции частота аллеля *Arg* и генотипа *ArgArg* выше, чем в дагестанской популяции [37].

Другой, исследуемый нами генетический маркер, локализовался в кодирующей области гена *TLR4* и реализовался через замену аминокислоты *Asp* на *Gly* в 299 положении. Данный маркер был выбран вследствие того, что в работах других авторов была показана ассоциация его с инфекцией мочевого тракта, сепсисом, стафилококковой инфекцией, панкреатитом, рассеянным склерозом и др. [164; 200; 214].

Замена аминокислотного состава рецептора в положении 299 потенциально могла повлиять на функциональную активность рецептора и, как следствие, на опосредованную активацию механизмов врожденного иммунитета в ответ на проникновение патогена. Так, известно, что этот полиморфизм приводит к изменению белковой последовательности внеклеточного домена *TLR4*, который распознает патоген ЛПС.

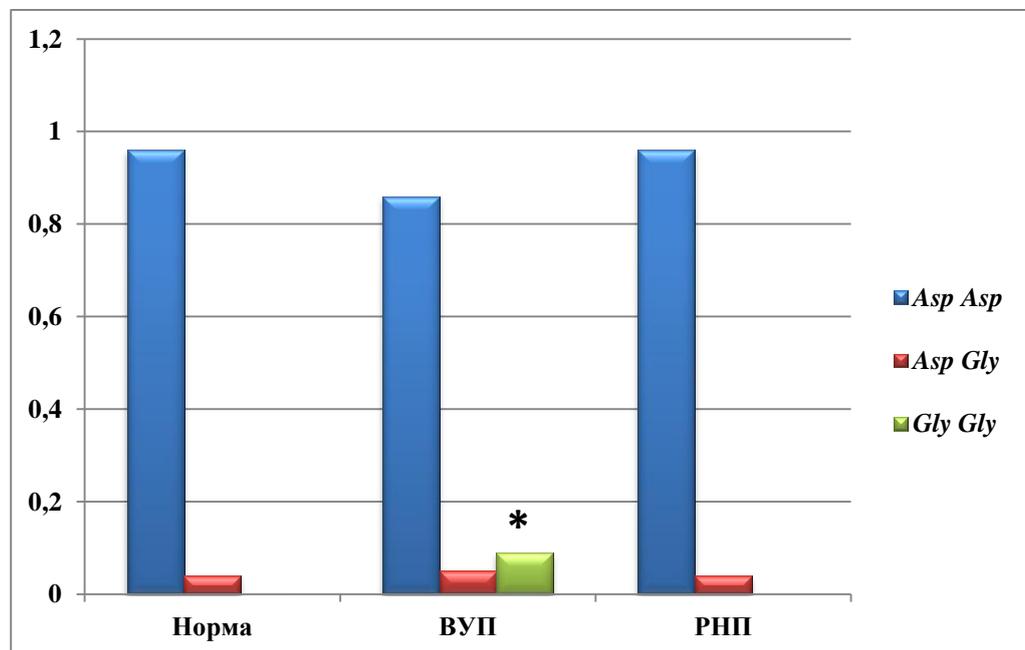
Результаты определения частоты аллелей и генотипов полиморфного маркера *Asp299Gly* гена *TLR4* в исследуемых группах представлены в Таблице 34. Нами показано, что и у родильниц, и у новорожденных доминировал аллель *Asp* и генотип *AspAsp* как в группе сравнения, так и в опытных группах. Было выявлено, что у родильниц аллель *Gly* и генотип *GlyGly* ассоциированы с развитием внутриутробного инфицирования плода. Частота аллеля *Gly* при этом составляет 0,11, а генотипа - 0,09, в группе сравнения частота аллеля - 0,02, а генотип не определяется. Данные представлены в Таблице 38 и Рисунке 37А.

Как видно, на Рисунке 37Б, у новорожденных аллель (частота 0,08) ассоциирована с внутриутробной инфекцией, а также генотип *AspGly* (частота 0,17). При этом в группе сравнения данный маркер не определялся.

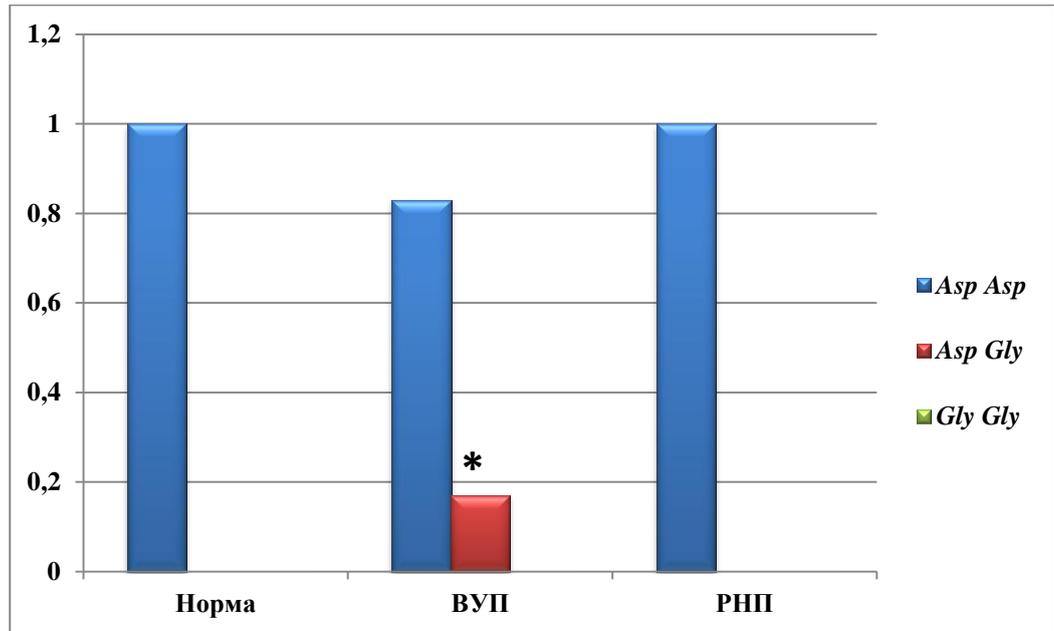
Таким образом, в дагестанской популяции нами был определен маркер в гене *TLR4*, который ассоциирован с ВУП (как аллели, так и генотипы). Однако, анализируя результаты русской популяции (на территории г. Москвы) можно сказать, что данный маркер не имеет подобной ассоциации [24].

Можно сделать заключение, что представленные маркеры могут быть использованы сугубо на региональном уровне.

Далее нами был проведен поиск других полиморфных маркеров в генах сигнальных рецепторов врожденного иммунитета, которые могут быть ассоциированы с риском развития преждевременных родов или с реализацией внутриутробной инфекции. В следующем разделе речь пойдет о маркере в гене  $\beta$ -дефенсин-1 человека.



А



**Б**

*Примечание.* По оси абсцисс – исследуемые группы, по оси ординат – частота встречаемости генотипа, \* - частота генотипа достоверно отличается от показателя в группе сравнения ( $p < 0,05$ ).

**Рис. 37 Распределение генотипов *Asp299Gly* гена *TLR4* у родильниц (А) и новорожденных (Б) в группах с ВУП, с РНП и в группе сравнения**

## **8.2. Изучение ассоциации полиморфного маркера *G(-20)A* у родильниц и новорожденных с НП**

Однонуклеотидная замена может изменить эффективность транскрипции и трансляции, так же как изменить аминокислотную последовательность и последующую структуру белка, и его функцию. В данном исследовании был выбран полиморфный маркер *G(-20)A* гена *DEFB1*, расположенный в нетранслируемой области. Предположительно этот SNPs может влиять на уровень экспрессии гена дефенсина. Jurevic RJ, et al. (2002) предположил, что изменения в экспрессии противомикробных пептидов (в частности дефенсинов) могут быть связаны с различной восприимчивостью к инфекционным агентам и, как следствие, нарушением процессов врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек [162]. Известно, что *HBD-1* в основном экспрессируется конститутивно, и, значит, полиморфизмы могут потенциально влиять на фоновый

уровень экспрессии. Ассоциация полиморфного маркера  $G(-20)A$  в гене *DEFB1* с инфекционной патологией новорожденных (в частности с пневмонией) до настоящего времени не исследовалась.

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера  $G(-20)A$  гена *DEFB1* у родильниц и у новорожденных во всех исследуемых группах представлены в Таблице 31.

Таблица 31

**Распределение аллелей и генотипов маркера  $G(-20)A$  гена *DEFB1* у родильниц и новорожденных в группах с ВУП, с РНП и в группе сравнения**

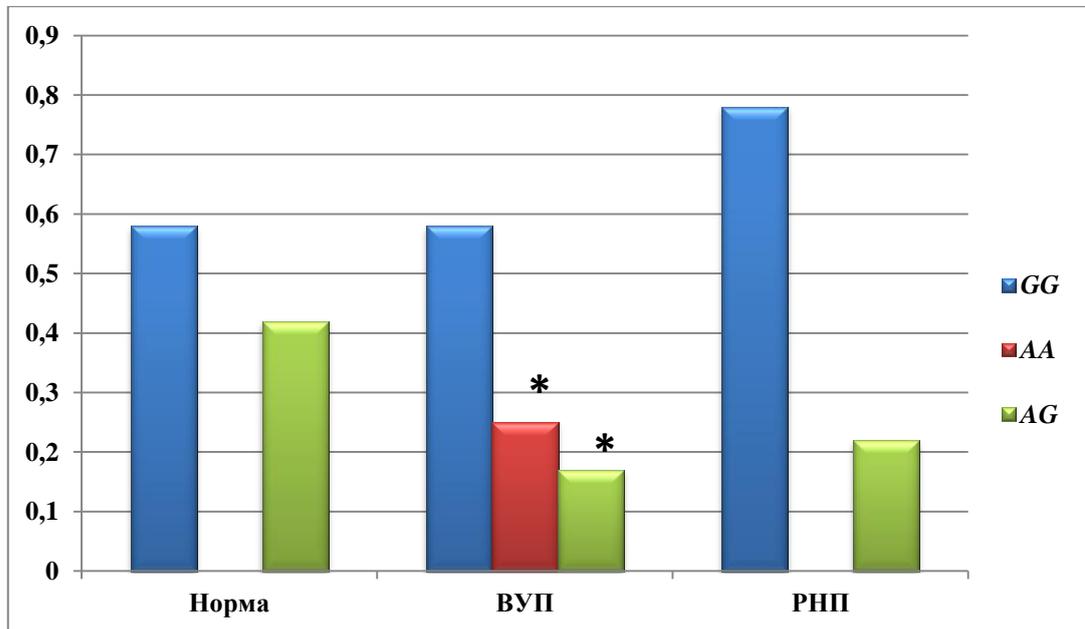
<b>родильницы</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>p</b>	<b>GG</b>	<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>p</b>
<b>Норма</b>	0,79	0,21	-	0,58	0,00	0,42	-
<b>ВУП</b>	0,66	0,34	<0,05	0,58	0,25	0,17	<0,05
<b>РНП</b>	0,89	0,11	≥0,05	0,78	0,00	0,22	≥0,05
<b>новорожденные</b>							
<b>новорожденные</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>p</b>	<b>GG</b>	<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>p</b>
<b>Норма</b>	0,73	0,27	-	0,52	0,05	0,43	-
<b>ВУП</b>	0,75	0,25	≥0,05	0,55	0,06	0,39	≥0,05
<b>РНП</b>	0,79	0,21	≥0,05	0,62	0,03	0,35	≥0,05

Анализ частот аллелей и генотипов полиморфного маркера  $G(-20)A$  у родильниц в исследуемых группах выявил некоторые достоверные различия. Так, частоты аллелей данного маркера в группе с внутриутробным инфицированием плода и в группе сравнения были следующими: аллель *G* - 0,66, 0,79, аллель *A* - 0,34, 0,21, соответственно. Частота аллелей у родильниц, у которых родились новорожденные с ВУП, достоверно не отличались от таковых в группе сравнения. Таким образом, аллель *A* (определяемая у родильниц) является маркером ВУП.

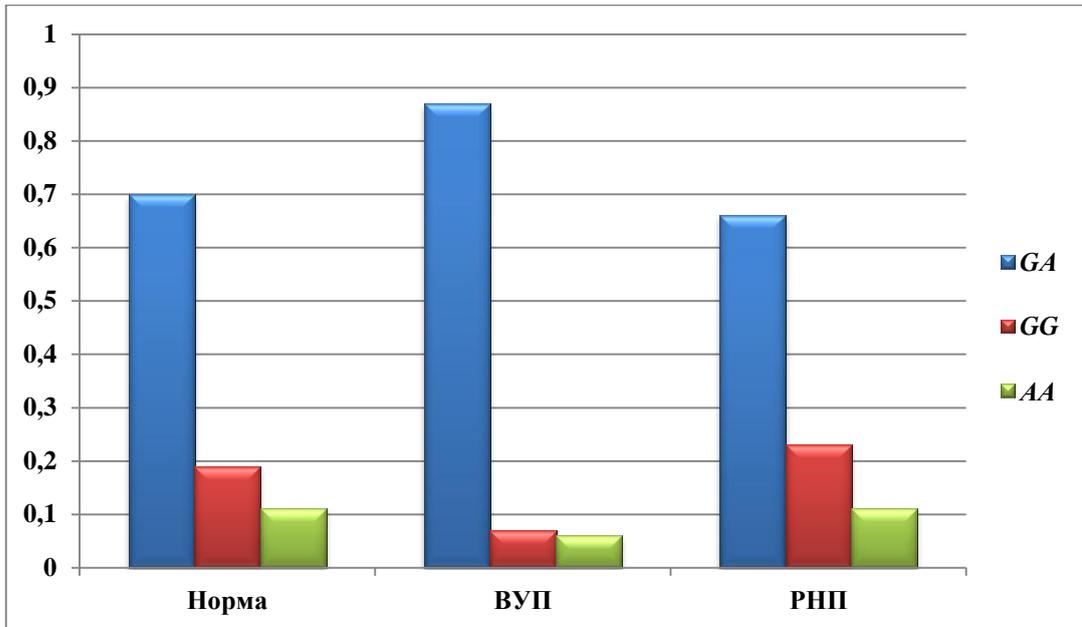
Частоты генотипов исследуемого маркера у родильниц в группе ВУП, РНП и группе сравнения были следующими:  $GG$  - 0,78, 0,58, 0,58;  $AA$  – 0, 0,25, 0;  $AG$  - 0,22, 0,17, 0,42, соответственно. Данные представлены на Рисунке 38А.

Показано, что в дагестанской популяции доминировал аллель  $G$  и генотип  $GG$  (частота составляла более 0,58). Было выявлено, что риск развития внутриутробного инфицирования плода ассоциирован с генотипом  $AA$  у родильниц, а генотип  $AG$  – является «протективным».

У новорожденных также проводили исследование ассоциации маркера  $G(-20)A$  гена  $DEFB1$  с риском развития ВУП и РНП. Среди аллелей доминировал аллель  $G$  (частота была выше 0,73 во всех группах) и генотип  $GG$  (частота превышала 0,52). Такая же тенденция была определена и у родильниц. Однако ассоциаций аллелей и генотипов маркера  $G(-20)A$  у новорожденных с патологией не было выявлено. Данные представлены в Таблице 31 и на Рисунке 38Б.



А



**Б**

*Примечание.* По оси абсцисс – исследуемые группы, по оси ординат – частота встречаемости генотипа, \* - частота генотипа достоверно отличается от показателя в группе сравнения ( $p < 0,05$ )

**Рис. 38 Распределение генотипов маркера  $G(-20)A$  гена  $DEFB1$  у родильниц (А) и новорожденных (Б) в группах с ВУП, с РНП и в группе сравнения**

Полученные результаты указывают на то, что генетический маркер  $G(-20)A$  гена  $DEFB1$  ассоциирован с риском развития ВУП у новорожденного. Это может быть связано с низкими показателями экспрессии этого гена и со сниженной защитой организма родильницы и как следствие инфицирование плода. Ранее другими учеными было показано, что преждевременные роды связаны со сниженным уровнем экспрессии гена  $\beta$ -дефенсин-1. Исследуемые полиморфные маркеры не приводят к изменению структуры белка, однако, существуют данные о том, что *SNPs* могут быть связаны с уровнем экспрессии гена дефенсина [24].

### 8.3. Изучение ассоциации полиморфных маркеров в генах *IL-10*, *IL-17* и *TNF $\alpha$* у родильниц и новорожденных с НП

В данном исследовании было выбрано три цитокина: *IL-10*, *IL-17* и *TNF $\alpha$* , генетические маркеры, которые могут быть ассоциированы с риском развития пневмонии. Известно, что все эти цитокины могут вырабатываться в ответ на активацию *TLRs*. *IL-17* и *TNF $\alpha$*  относятся к провоспалительным цитокинам.

По данным литературы показано, что увеличение уровня провоспалительных цитокинов, в частности *TNF $\alpha$*  и *IL-17*, приводит к активации защитных механизмов на локальном уровне, но при избыточной продукции может приводить к разрушению ткани [92]. *IL-17* также ассоциирован с аутоиммунной патологией. Снижение выработки *TNF $\alpha$*  может быть связано с нарушением защитной функции врожденного иммунитета на локальном уровне и, как следствие, увеличение агрессии патогенной микрофлоры.

Помимо провоспалительных цитокинов в работе также был исследован противовоспалительный цитокин - *IL-10*. Известно, что снижение экспрессии данного цитокина может приводить к активации провоспалительных механизмов и вероятно к разрушению ткани, а увеличение – к супрессии мукозального иммунитета.

На первом этапе нами был проведен сравнительный анализ распределения аллелей и генотипов полиморфных маркеров *TNFA* (-308 G/A) и *IL17A* (-197 G/A), которые локализованы в промоутерных областях генов. Часто изменения последовательности ДНК в промоутерной области гена связано с изменением экспрессии белка.

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *TNFA* (-308 G/A) у родильниц и у новорожденных во всех исследуемых группах представлены в Таблице 32.

Распределение аллелей и генотипов маркеров *TNF $\alpha$  -308 G>A* и *IL17A -197 G>A* у родильниц и новорожденных в группах с ВУП, с РНП и в группе сравнения

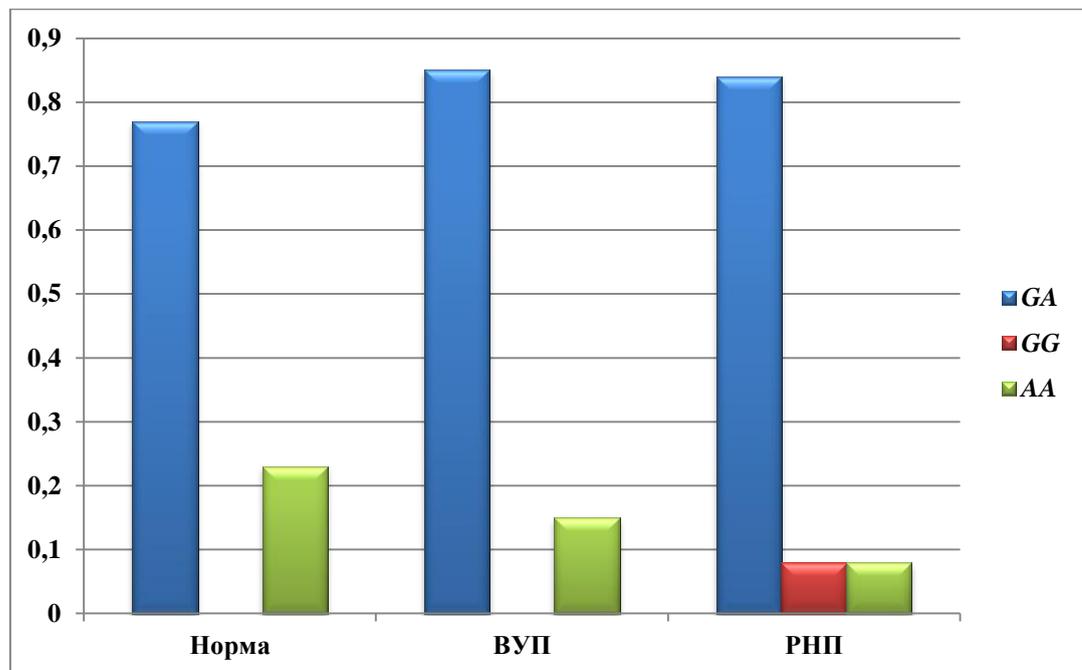
<i>TNF<math>\alpha</math> -308 G&gt;A (rs1800629)</i>							
мамы	A	G	p	GA	GG	AA	p
Норма	0,62	0,38	-	0,77	0	0,23	-
ВУП	0,58	0,42	$\geq 0,05$	0,85	0	0,15	$\geq 0,05$
РНП	0,50	0,50	$\geq 0,05$	0,84	0,08	0,08	$\geq 0,05$
<i>IL17A -197 G&gt;A (rs2275913)</i>							
мамы	A	G	p	GA	GG	AA	p
Норма	0,26	0,74	-	0,43	0,52	0,05	-
ВУП	0,31	0,69	$\geq 0,05$	0,61	0,39	0	
ВАП	0,34	0,66	$\geq 0,05$	0,34	0,63	0,03	$\geq 0,05$
дети	A	G	p	GA	GG	AA	p
Норма	0,66	0,34	-	0,31	0,50	0,19	-
ВУП	0,71	0,29	$\geq 0,05$	0,42	0,50	0,08	$\geq 0,05$
ВАП	0,72	0,28	$\geq 0,05$	0,44	0,50	0,06	$\geq 0,05$

На Рисунке 39А показано, что во всех группах доминировал аллель *A* и гетерозиготный генотип. При этом достоверных различий между частотами аллелей и генотипов в группах с пневмонией новорожденных, внутриутробным инфицированием и группой сравнения в материале от родильниц выявлено не было.

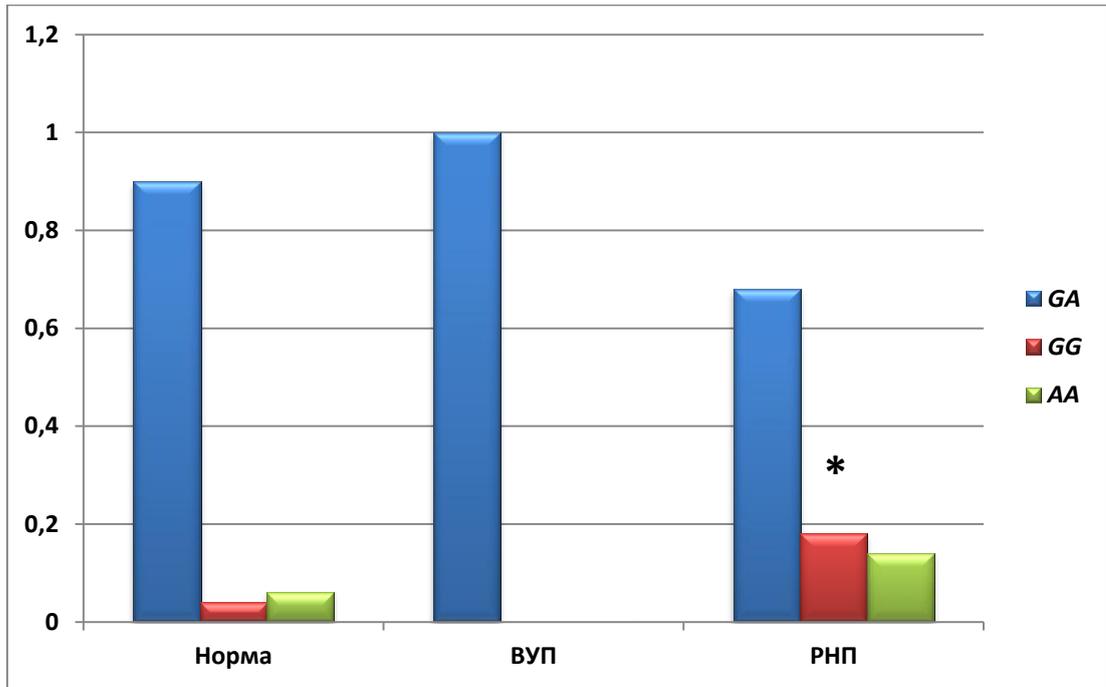
Иная тенденция наблюдалась непосредственно у новорожденных. Аллели в материале от новорожденных во всех группах распределились приблизительно одинаково.

В группе новорожденных с пневмонией определяли достоверное увеличение частоты генотипа *GG*, которая составляла 0,18 относительно 0,04 – в группе сравнения.

Таким образом, маркер *GG TNFA (-308 G/A)* ассоциирован с риском развития пневмонии у новорожденных и может быть использован в практике. Вероятно, наличие данной замены в геноме новорожденных может быть связано с нарушением баланса выработки  $TNF\alpha$  и нарушением защиты, как показано на Рисунке 39Б.



**A**



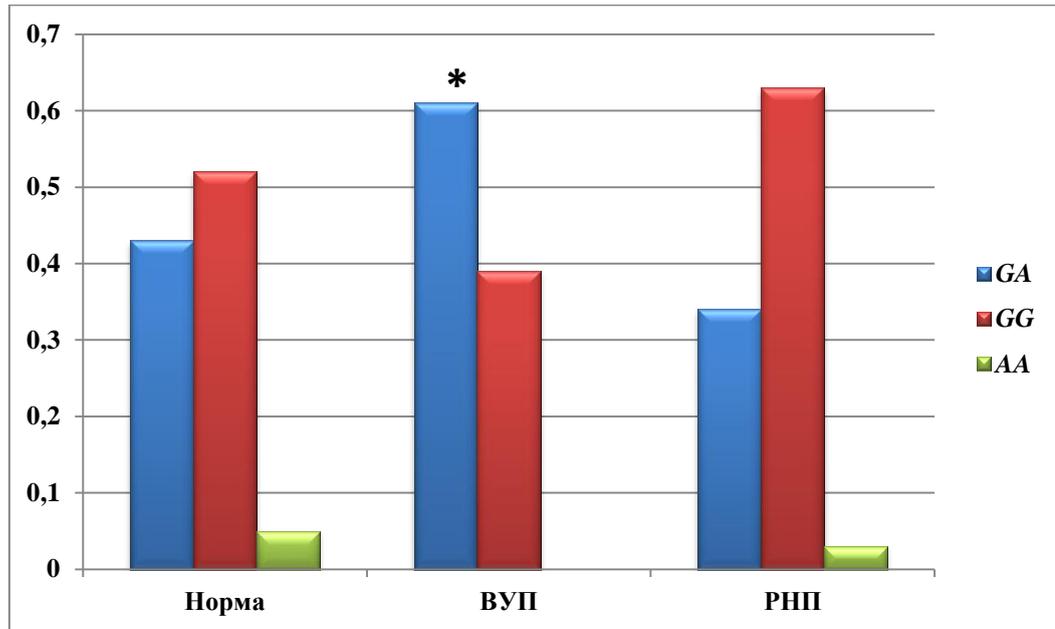
**Б**

*Примечание.* По оси абсцисс – исследуемые группы, по оси ординат – частота встречаемости генотипа, \* - частота генотипа достоверно отличается от показателя в группе сравнения ( $p < 0,05$ )

**Рис.39 Распределение генотипов маркера TNF $\alpha$  (-308 G/A) у родильниц (А) и новорожденных (Б) в группах с ВУП, с РНП и в группе сравнения**

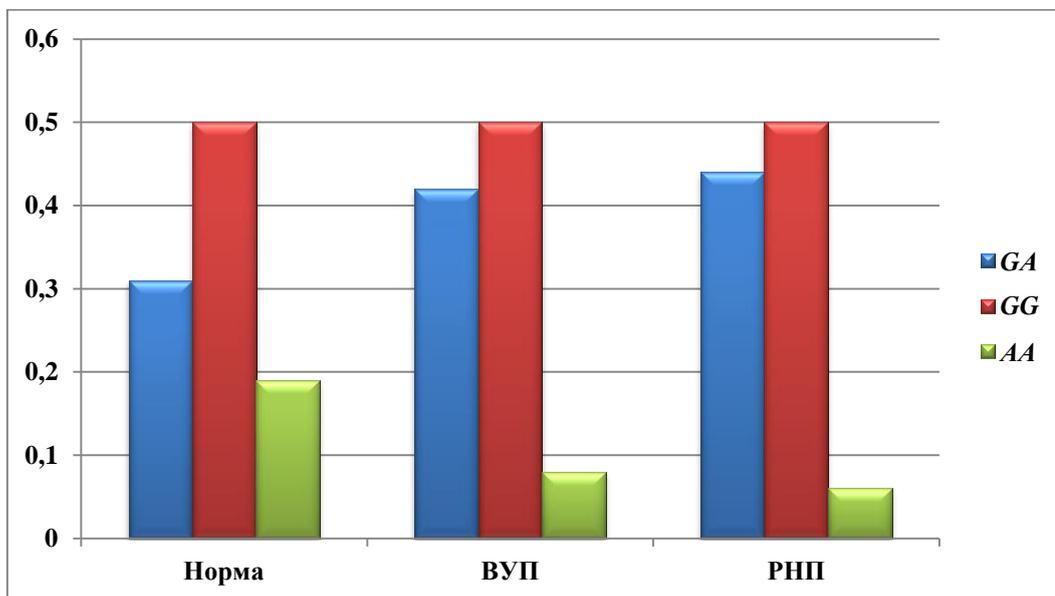
Другой провоспалительный цитокин, который был исследован в работе - IL17. В клиническом материале от родильниц распределение частот аллелей среди исследуемых групп было следующее: аллель A – 0,26; 0,31 и 0,34, аллель G – 0,74; 0,69 и 0,66 в группах сравнения, ВУП и РНП, соответственно. Достоверных различий при этом не было определено. При исследовании частот генотипов было выявлено два маркера – генотип GG был ассоциирован с отсутствием развития внутриутробной инфекции, т.е. можно считать его «протективным». В то же время наличие генотипа GA ассоциировано с развитием инфекции у плода. Можно предположить, что нарушение экспрессии цитокина IL17 у родильницы может служить причиной инфицирования плода.

Распределение генотипов маркера IL17A (-197 G/A) у родильниц представлено на Рисунке 40А.



**А**

Как видно из Рисунка 40Б у новорожденных во всех группах доминирует аллель *G* и генотип *GG*, но достоверных отличий между этими показателями в группах выявлено не было.



**Б**

*Примечание.* По оси абсцисс – исследуемые группы, по оси ординат – частота встречаемости генотипа, \* - частота генотипа достоверно отличается от показателя в группе сравнения ( $p < 0,05$ )

**Рис. 40 Распределение генотипов маркера *IL17A* (-197 G/A) у родильниц (А) и новорожденных (Б) в группах с ВУП, с РНП и в группе сравнения**

На следующем этапе были исследованы полиморфные маркеры (-1082A>G) и (-592A>C) в гене *IL10*. Как уже говорилось ранее, *IL10* – противовоспалительный цитокин и изменения в его промотерной области могут привести к изменению экспрессии белка и к нарушению баланса про- и противовоспалительных цитокинов.

Во всех исследуемых группах определялись аллели полиморфного маркера *IL10* (-1082 A>G), но достоверных изменений в распределении не было обнаружено. У родильниц выявлено, что генотип GA (частота которого составила 0,75 относительно 0,47 – в группе сравнения) ассоциирован с развитием пневмонии у новорожденных. При этом генотип AA – является «протективным».

В настоящем исследовании было показано, что генотип GG, который определяется как у родильниц, так и у новорожденных является «протективным» относительно развития внутриутробной инфекции плода.

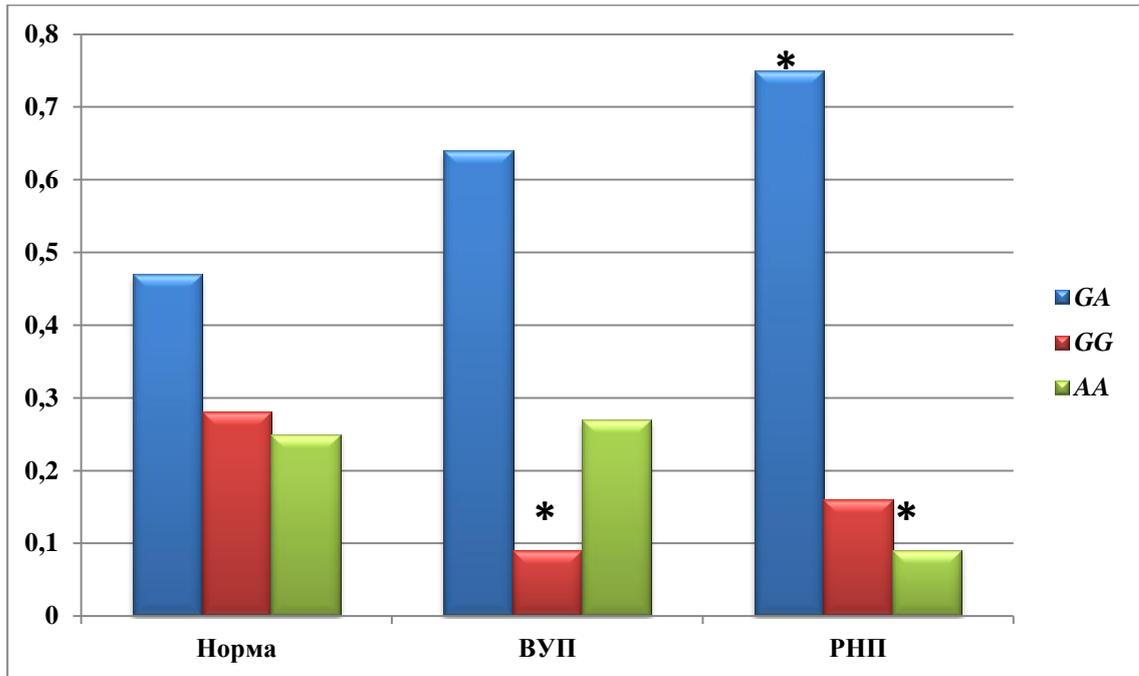
Как видно из Таблицы 33 и на Рисунке 41, частота данного генотипа составляет 0,09 (относительно 0,28 в группе сравнений у родильниц) и 0,07 (относительно 0,19 в группе сравнения у новорожденных).

При оценке распределения аллелей и генотипов полиморфного маркера (-592A>C) в гене *IL10* было показано следующее. У родильниц не было определено достоверных ассоциаций частот аллелей и генотипов с внутриутробной пневмонией и ранней неонатальной пневмонией новорожденных.

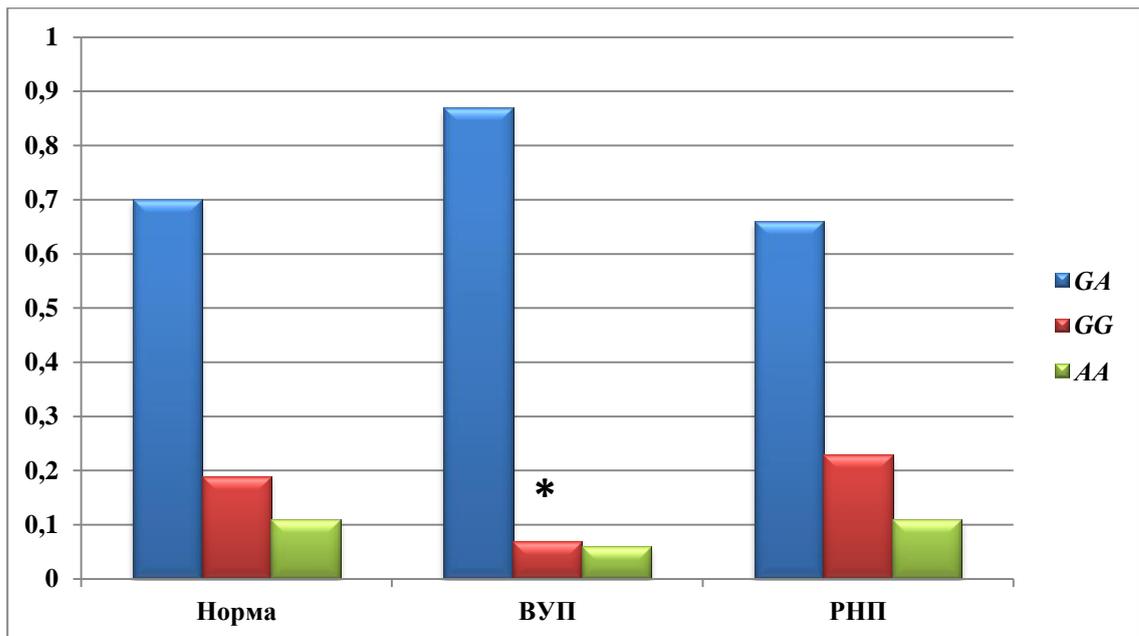
В Таблице 33 и на Рисунке 41 показано, что у новорожденных были найдены две ассоциации: генотип GA - «протективный» маркер развития внутриутробного инфицирования плода (частота составляла 0,20 относительно 0,42 в группе сравнения), маркер GG – ассоциация с риском развития ВУП (частота составляла 0,80 относительно 0,58 в группе сравнения).

Распределение аллелей и генотипов маркеров *IL10* (-1082A>G) и *IL10* (-592A>C) у родильниц и новорожденных в группах с ВУП, с РНП и в группе сравнения

<i>IL10</i> -1082 A>G (rs 1800896)							
мамы	A	G	p	GA	GG	AA	p
Норма	0,51	0,49	-	0,47	0,28	0,25	-
ВУП	0,59	0,41	≥0,05	0,64	0,09	0,27	<0,05
РНП	0,47	0,53	≥0,05	0,75	0,16	0,09	<0,05
<i>IL10</i> -592 A>C (rs1800872)							
мамы	C	A	p	CA	CC	AA	p
Норма	0,74	0,26	-	0,52	0,48	0,00	-
ВУП	0,69	0,31	≥0,05	0,61	0,39	0,00	≥0,05
РНП	0,78	0,22	≥0,05	0,44	0,56	0,00	≥0,05
Дети	C	A	p	CA	CC	AA	p
Норма	0,79	0,21	-	0,42	0,58	0,00	-
ВУП	0,90	0,10	≥0,05	0,20	0,80	0,00	<0,05
РНП	0,81	0,19	≥0,05	0,37	0,63	0,00	≥0,05



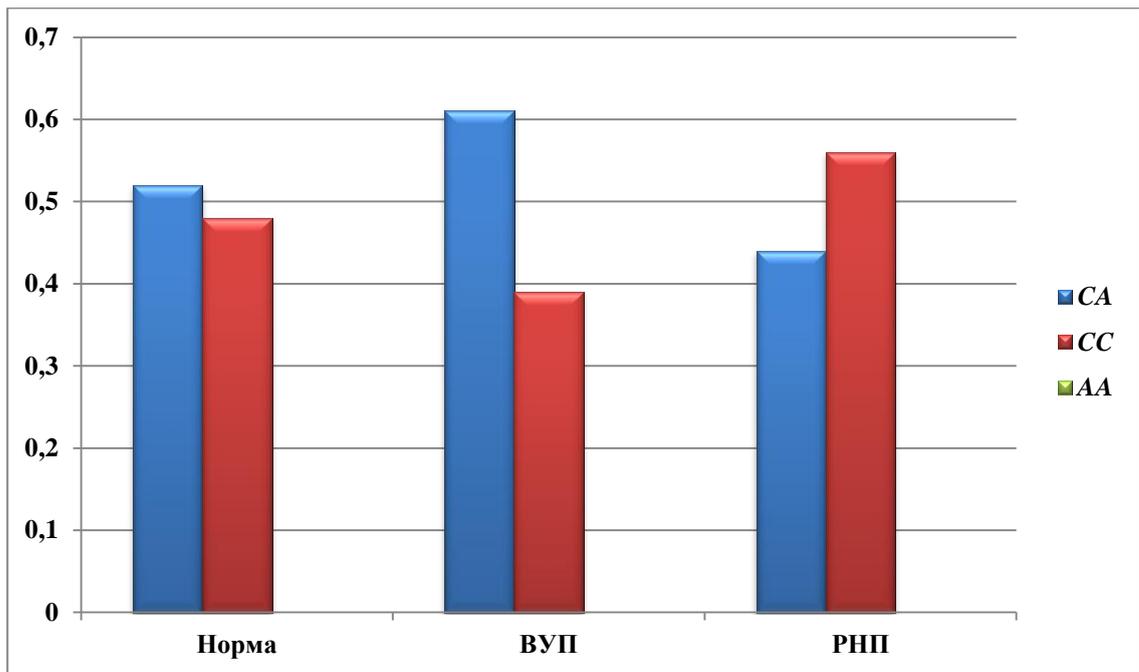
А



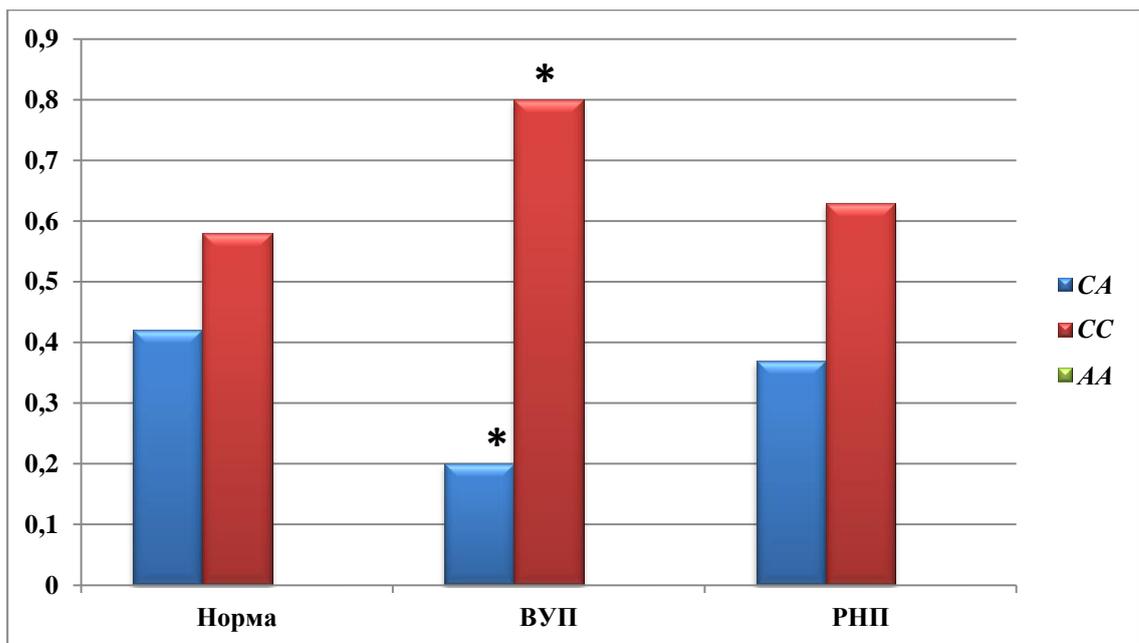
Б

*Примечание.* По оси абсцисс – исследуемые группы, по оси ординат – частота встречаемости генотипа, \* - частота генотипа достоверно отличается от показателя в группе сравнения ( $p < 0,05$ )

**Рис. 41** Распределение генотипов маркера *IL10* (-1082A>G) у родильниц (А) и новорожденных (Б) в группах с ВУП, с РНП и в группе сравнения



А



Б

*Примечание.* По оси абсцисс – исследуемые группы, по оси ординат – частота встречаемости генотипа, \* - частота генотипа достоверно отличается от показателя в группе сравнения ( $p < 0,05$ )

**Рис. 42. Распределение генотипов маркера *IL10* (-592A>C) у родильниц (А) и новорожденных (Б) в группах с ВУП, с РНП и в группе сравнения**

На следующем этапе нами проводился поиск ассоциаций гаплотипов в генах *TNFA* и *IL-10* с ранней неонатальной пневмонией и внутриутробной инфекцией. Известно, что однонуклеотидные полиморфные маркеры могут оказывать существенное влияние на предрасположенность индивидуума к той или иной патологии, однако гораздо большее значение имеет совокупность сцепленных генов на одной хромосоме. Поэтому, помимо исследования связи между однонуклеотидными полиморфизмами *G-308A* и *G4682A* в гене *TNFA* и *A-1082G* и *A-592C* в гене *IL-10* и патологиями плода, мы провели гаплотипный анализ.

Сначала был проведен анализ гаплотипов в гене *TNFA* среди родильниц с внутриутробной инфекцией у плода, ранней неонатальной пневмонией и контрольной группой. В исследуемых выборках из девяти возможных вариантов гаплотипов встречалось только семь, данные гаплотипы и распределение их частот по группам представлены в Таблице 34.

Таблица 34

Распределение частот гаплотипов в гене *TNFA* родильниц и результат анализа их ассоциаций с ранней неонатальной пневмонией у новорожденного и внутриутробной инфекцией у плода

Гаплотип		Частоты		<i>p</i>	OR	95% CI	Частоты		<i>p</i>	OR	95% CI
<i>TNFα</i> -308 <i>G&gt;A</i> (rs1800629)	<i>TNF</i> 4682 <i>G&gt;A</i> (rs1800629)	РНИ	Конт- роль				ВУП	Конт- роль			
<i>GA</i>	<i>GA</i>	0,089	0,139	>0,05	1,66	0,63 - 4,36	0,089	0,139	>0,05	1,66	0,50 - 5,55
<i>GA</i>	<i>GG</i>	0,400	0,177	<b>&lt;0,01</b>	<b>3</b>	<b>0,16 - 0,66</b>	0,200	0,177	>0,05	0,86	0,34 - 2,19
<i>GA</i>	<i>AA</i>	0,011	0,000	>0,05	0,00	0,00	0,000	0,000	>0,05	0,00	0,00
<i>GG</i>	<i>GA</i>	0,011	0,025	>0,05	2,31	0,21 - 26,00	0,000	0,025	>0,05	0,00	0,00
<i>GG</i>	<i>GG</i>	0,433	0,582	>0,05	1,82	0,99 - 3,36	0,667	0,582	>0,05	0,70	0,32 - 1,50
<i>AA</i>	<i>GA</i>	0,000	0,025	>0,05	0,00	0,00	0,022	0,025	>0,05	1,14	0,10 - 12,97
<i>AA</i>	<i>GG</i>	0,056	0,051	>0,05	0,91	0,23 - 3,50	0,022	0,051	>0,05	2,35	0,25 - 21,67

Как видно из таблицы, достоверных отличий при сравнительном анализе гаплотипов группы с внутриутробной инфекцией и контрольной выборки найдено не было.

Статистически значимые различия были установлены между группой с ранними неонатальными пневмониями и контролем. Как показано на Рисунке 43 гаплотип *GAGG* достоверно чаще встречался при патологии, чем в группе здоровых женщин (0,400 и 0,177, OR = 3,  $p \leq 0,01$ ).

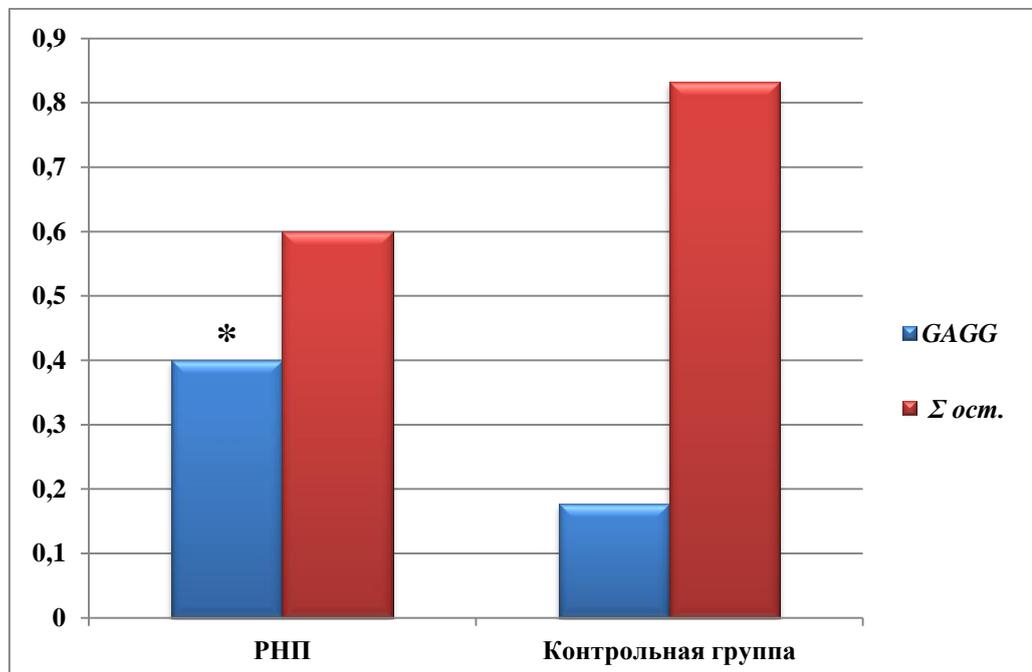


Рис. 43 Распределение частот гаплотипа *GAGG* в гене *TNFA* в группе с ранней неонатальной пневмонией у новорожденного и контрольной выборке у родильниц. \* -  $p \leq 0,01$

В гене *IL-10* был проведен анализ шести гаплотипов, остальные три варианта гаплотипов в исследуемых выборках не встречались. Данные частот их выявления у родильниц и анализа их ассоциаций с ранней неонатальной пневмонией и внутриутробной инфекцией у плода приведены в таблице 35.

Таблица 35

Распределение частот гаплотипов в гене *IL-10* родильниц и результат анализа их ассоциаций с ранней неонатальной пневмонией у новорожденного и внутриутробной инфекцией у плода

Гаплотип		Частоты		<i>p</i>	OR	95% CI	Частоты		<i>p</i>	OR	95% CI
<i>IL10 - 1082 A&gt;G</i> (rs 1800896)	<i>IL10 -592 A&gt;C</i> (rs1800872)	РНП	Конт- роль				ВУП	Конт- роль			
<i>AG</i>	<i>AC</i>	0,341	0,259	>0,05	0,68	0,23 - 1,96	0,364	0,259	>0,05	0,61	0,14 - 2,75
<i>AG</i>	<i>CC</i>	0,455	0,185	<b>&lt; 0,05</b>	<b>3,7</b>	<b>0,09 - 0,85</b>	0,273	0,185	>0,05	0,61	0,12 - 3,14
<i>GG</i>	<i>AC</i>	0,091	0,148	>0,05	1,74	0,40 - 7,62	0,091	0,148	>0,05	1,74	0,17 - 17,59
<i>GG</i>	<i>CC</i>	0,023	0,111	>0,05	5,38	0,53 - 54,57	0,000	0,111	>0,05	0,00	0,00
<i>AA</i>	<i>AC</i>	0,045	0,185	>0,05	4,77	0,86 - 26,63	0,182	0,185	>0,05	1,02	0,17 - 6,27
<i>AA</i>	<i>CC</i>	0,045	0,111	>0,05	2,63	0,41 - 16,83	0,091	0,111	>0,05	1,25	0,12 - 13,51

При проведении сравнительного анализа распределения гаплотипов между группой с ранней неонатальной пневмонией и контрольной группой, представленного на Рисунке 44 выявили достоверно повышенную частоту гаплотипа *AGCC* в гене *IL-10* (0,455 и 0,185, OR = 3,7,  $p \leq 0,05$ ). Статистических различий между ранней неонатальной пневмонией и группой сравнения у родильниц при анализе гаплотипов в гене *IL-10* выявлено не было.

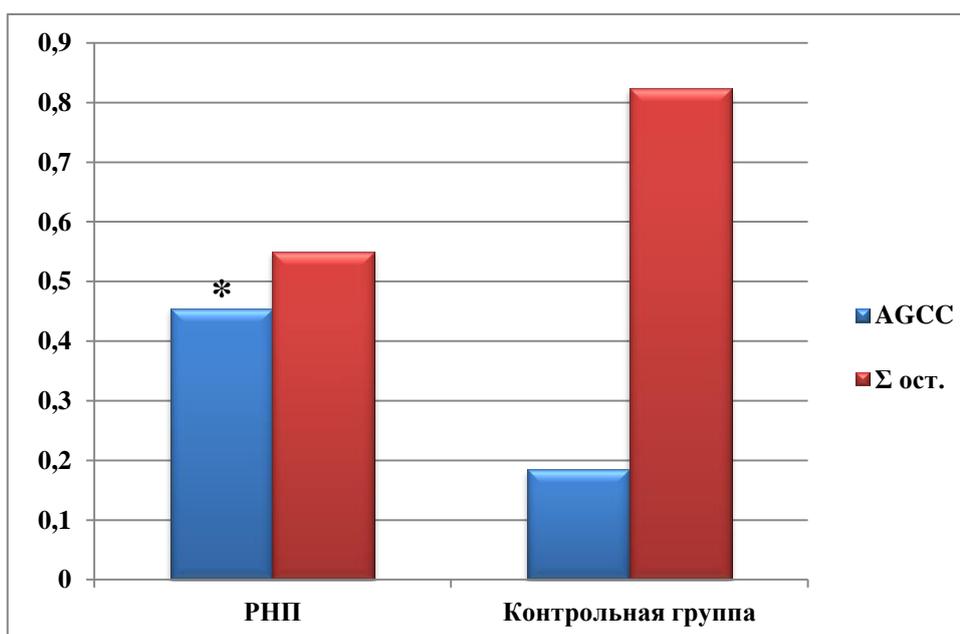


Рис. 44 Распределение частот гаплотипа *AGCC* в гене *IL-10* в группе с ранней неонатальной пневмонией у новорожденного и контрольной выборке у родильниц. \* -  $p \leq 0,05$

Помимо анализа гаплотипов в генах *TNFA* и *IL-10* родильниц исследование было также проведено непосредственно среди новорожденных с ранней неонатальной пневмонией и внутриутробной инфекцией. В гене *TNFA* из девяти возможных вариантов гаплотипов у новорожденных встречались только четыре, причем во всех исследуемых группах преимущественно встречался гаплотип *GGGG*. Таким образом, сравнительный анализ распределений гаплотипов в гене *TNFA* у новорожденных не выявил достоверных различий в группах с ранней

неонатальной пневмонией и внутриутробной инфекцией по сравнению с контрольной группой, результаты представлены в Таблице 36. Статистически значимые различия при исследовании гаплотипов в гене *IL-10* также не были выявлены, данные представлены в Таблице 37.

**Распределение частот гаплотипов в гене *TNFA* новорожденных и результат анализа их ассоциаций с ранней неонатальной пневмонией и внутриутробной инфекцией**

Гаплотип		Частоты		<i>p</i>	OR	95% CI	Частоты		<i>p</i>	OR	95% CI
<i>TNFA</i> -308 G>A (rs1800629)	<i>TNF</i> 4682 G>A (rs1800629)	РНП	Конт- роль				ВУП	Конт- роль			
<i>GA</i>	<i>GA</i>	0,057	0,030	>0,05	0,52	0,04 - 5,97	0,000	0,030	>0,05	0,00	0,00
<i>GA</i>	<i>GG</i>	0,114	0,030	>0,05	0,24	0,03 - 2,29	0,045	0,030	>0,05	0,66	0,04 - 11,08
<i>GG</i>	<i>GA</i>	0,029	0,000	>0,05	0,00	0,00	0,000	0,000	0,00	0,00	0,00
<i>GG</i>	<i>GG</i>	0,800	0,939	>0,05	3,88	0,74 - 20,23	0,955	0,939	>0,05	0,74	0,06 - 8,67

**Распределение частот гаплотипов в гене *IL-10* новорожденных и результат анализа их ассоциаций с ранней неонатальной пневмонией и внутриутробной инфекцией**

Гаплотип		Частоты		<i>p</i>	OR	95% CI	Частоты		<i>p</i>	OR	95% CI
<i>IL10 -1082 A&gt;G</i>	<i>IL10 -592 A&gt;C</i>	РНП	Контр.				ВУП	Контр.			
<i>AG</i>	<i>AC</i>	0,349	0,350	>0,05	1,01	0,33 - 3,06	0,250	0,350	>0,05	1,62	0,14 - 18,58
<i>AG</i>	<i>CC</i>	0,302	0,300	>0,05	0,99	0,31 - 3,14	0,500	0,300	>0,05	0,43	0,05 - 3,79
<i>GG</i>	<i>AC</i>	0,093	0,050	>0,05	0,51	0,05 - 4,91	0,000	0,050	>0,05	0,00	0,00
<i>GG</i>	<i>CC</i>	0,163	0,150	>0,05	0,91	0,21 - 3,95	0,250	0,150	>0,05	0,53	0,04 - 6,95
<i>AA</i>	<i>AC</i>	0,047	0,100	>0,05	2,28	0,30 - 17,46	0,000	0,100	>0,05	0,00	0,00
<i>AA</i>	<i>CC</i>	0,047	0,050	>0,05	1,08	0,09 - 12,65	0,000	0,050	>0,05	0,00	0,00

На современном этапе развития молекулярной генетики перспективным направлением диагностики неонатальных пневмоний выступает изучение роли генных полиморфизмов компонентов врождённого иммунитета, которое может привести к лучшему пониманию патогенеза и разработке эффективных методов профилактики и лечения таких больных.

Воспалительный ответ существенно отличается по своей интенсивности и продолжительности у разных пациентов, протекая у одних остро, тогда как у других может приобретать затяжной хронический характер [24]. Генетически обусловленные индивидуальные реакции организма определяют развитие заболевания на 20-40%, а в 60-80% случаев важны фенотипические особенности индивидуума [56].

Поиск генетических маркеров, контролирующих развитие болезней дыхательных путей у новорожденных, на современном этапе стало одной из важных проблем генетики. Основную трудность в практике врача занимает полиэтиологичный характер заболеваний дыхательной системы.

На сегодняшний день не до конца изучены патогенетические пути поражения легких у новорожденных, обусловленные наличием полиморфизмов генов медиаторов воспаления.

Будущее медицины лежит в возможности проведения молекулярно-генетической диагностики и выявлении предрасположенности организма к заболеваниям, либо его устойчивости к ним.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Начало самостоятельного дыхания является одним из самых важных факторов приспособления ребенка к внеутробному существованию, внутриутробное и интранатальное инфицирование и развитие воспалительного процесса - одна из основных причин высокой частоты нарушений респираторной адаптации [116].

Пневмония - острое инфекционное заболевание, характеризующееся очаговым воспалительным процессом в респираторных отделах ткани легкого, симптомами системного воспаления и инфильтративными изменениями на рентгенограмме. Последнее условие, являющееся, по мнению ВОЗ, «золотым стандартом» диагностики, позволяет сузить круг состояний, трактуемых как пневмония [45; 105; 117].

Всё чаще стали регистрироваться неонатальные пневмонии с крайне тяжелым и «молниеносным» течением, появляются антибиотикорезистентные и антибиотикозависимые микроорганизмы, затрудняющие лечение и прогноз заболевания. Рост тяжелых форм заболеваний с летальным исходом и обуславливает актуальность изучения неонатальных пневмоний [73; 90; 121; 155], частота которых среди новорожденных ОРПН достигает 40% [11; 45; 112; 115; 116; 177].

Разнообразие этиологической структуры пневмоний у новорожденных существенно отличается от таковой среди других возрастных периодов. В этиологии неонатальных пневмоний при трансплацентарном пути инфицирования особое значение имеют цитомегаловирусная и герпетическая инфекция. При перинатальном инфицировании важная роль отводится стрептококку группы В, кишечной палочке, анаэробным бактериям, хламидиям, микоплазме, цитомегаловирусной инфекции, *Listeria monocytogenes*. Постнатальный путь инфицирования обусловлен коагулазонегативными стафилококками, золотистым стрептококком, синегнойной палочкой, аденовирусами, цитомегаловирусами, вирусами гриппа А, В, парагриппа, РС-вирусом, кандидами, кишечной палочкой,

микобактериями туберкулеза и др. [51; 73; 97]. Авторами отмечено наличие региональных различий этиоструктуры неонатальных пневмоний [97].

В знаниях о неонатальных пневмониях имеется пробел, касающийся образования биопленок на поверхностях, как биогенного, так и абиогенного происхождения, колонизированных микроорганизмами, и, следовательно, на всех этих поверхностях закономерно формируются биопленки. Такие данные можно использовать в качестве основы для разработки методов диагностики неонатальных пневмоний.

Вопросы о действии микроорганизмов, возбудителей неонатальных пневмоний за счет факторов патогенности на организм новорожденного и влиянии на показатели врожденного иммунитета, проблемы диагностики и антибиотикорезистентности возбудителей неонатальных пневмоний являются малоизученными направлениями современной медицинской микробиологии [73].

Предрасположенность новорожденных к возникновению инфекционных осложнений может быть обусловлена не только особенностями госпитальных штаммов микроорганизмов, но и состоянием иммунной системы новорожденных. Большое значение в распознавании патогенов имеют факторы врожденного иммунитета (Toll-подобные рецепторы, цитокины, противомикробные пептиды) [19; 22]. Закономерно предположить, что изменения в системе врожденного иммунитета могут служить одной из причин, а так же являться прогностическим маркером развития неонатальных пневмоний [22; 24]. Так как, этиологическим фактором неонатальных пневмоний является условно-патогенная микробиота, в инициации воспалительного процесса крайне значима активация TLR, в том числе и за счёт снижения иммунореактивности [22].

Актуальным является дальнейший поиск и внедрение в клиническую практику точных, высокоспецифичных, доступных в стационарах, высокоинформативных и прогностически значимых методов диагностики, обладающих возможностью на доклинической стадии выявить вероятный риск развития пневмоний у новорожденных.

Особую актуальность данная проблема имеет для Республики Дагестан в связи с сохраняющимся высоким уровнем младенческой смертности, в значительной мере обусловленной несвоевременной диагностикой и неблагоприятными исходами пневмоний у новорожденных детей.

Решению этих вопросов посвящено настоящее исследование, целью которого явилось - разработать новые подходы к диагностике неонатальных пневмоний, определить характер микробного биоценоза и патогенетические механизмы повреждения врожденного иммунитета у новорожденных для обоснования рациональных критериев выбора эффективной этиотропной антибактериальной терапии.

В рамках проведенной работы нами было проведено комплексное научное изучение эффективных методов диагностики неонатальных пневмоний.

На основании клинико-микробиологических и иммунологических исследований получены новые данные по современному видовому спектру, антибиотикорезистентности выделенных штаммов микроорганизмов и особенностям клинического течения неонатальных пневмоний. Кроме того, научно обоснована роль факторов патогенности возбудителей неонатальных пневмоний на организм новорожденного и их влияние на показатели врожденного иммунитета.

Также получены новые региональные данные о высокой информативности изучения иммунных показателей в качестве маркеров развития пневмоний у новорожденных.

Клинико-микробиологическое и иммунологическое обследование проведено у 230 новорожденных с диагнозом внутриутробная и 246 с диагнозом - ранняя неонатальная пневмония, находящихся в ОРИТН. Группу сравнения составили 103 здоровых ребенка из отделения физиологии родильного дома.

На основании клинико-лабораторных данных диагноз подтверждался в течении первых 72 часов жизни новорожденных. По клиническим характеристикам все новорожденные дети находились в тяжелом состоянии, с выраженными нарушениями дыхательной деятельности (тахипноэ, апноэ,

раздувание крыльев носа, ретракция грудной клетки, «хрюкающее» дыхание, нарастание проявлений дыхательной недостаточности.). У новорожденных отмечался цианоз, угнетение или возбудимость ЦНС, нарушения температурного контроля и др.

В работе учитывались факторы, указывающие на возможную реализацию инфекционного процесса у ребенка. И первый такой фактор - состояние здоровья родильниц (анемия во время беременности, наличие хронических очагов инфекции, обострение во время беременности вирусных и бактериальных инфекций и т.д.). Так, родильниц с осложненным акушерско-гинекологическим анамнезом (ОАГА) значительно чаще наблюдали в группе новорожденных с ранними неонатальными пневмониями (РНП), чем в группах детей с внутриутробными пневмониями (ВУП) и здоровых новорожденных. Родильницы контрольной группы были относительно здоровы (анемия легкой и средней тяжести наблюдалась в 11,2% случаев ( $p < 0,01$ )). Остальные заболевания наблюдались только в основных группах родильниц.

В группе РНП достоверно чаще выявлялось экстрагенитальная патология, чем в группе с ВУП ( $p < 0,01$ ). Экстрагенитальная заболеваемость представлена в равных количествах анемией ВУП - 61,4% и РНП - 68,2%, ( $p > 0,05$ ). Хроническую фетоплацентарную недостаточность при ВУП - 12,3%, при РНП - 16,7% и отслойку плаценты (9,6% и 20,8% соответственно) наблюдали в основных группах, а в контрольной группе встречали в единичных случаях. Достоверно чаще в группе родильниц новорожденных с внутриутробными пневмониями отмечался гестоз - 16,8% ( $p < 0,01$ ), а отслойку плаценты наблюдали чаще у родильниц в группе новорожденных с ранними неонатальными пневмониями - 20,8% ( $p < 0,01$ ).

Анализ анамнестических характеристик родильниц новорожденных с диагнозом ВУП и РНП позволил установить, что факторами риска развития пневмонии у новорожденных являются следующие ОАГА, отмечавшиеся у родильниц, это: анемия, наличие гестоза, хроническая фетоплацентарная недостаточность и отслойка плаценты.

При оценке распределения новорожденных по половой принадлежности обнаружилось статистически значимое преобладание мальчиков в группах новорожденных с ВУП и РНП: 67% и 67,8 % соответственно против 51,8 %, что коррелирует с литературными данными [73; 110].

Оценка клинических признаков, отражающих состояние новорожденного при рождении, выявил влияние асфиксии (оцененной по шкале Апгар) и задержки внутриутробного развития плода (ЗВУР) на формирование дыхательных расстройств у новорожденных в группах наблюдения.

Для группы здоровых новорожденных оценка по шкале Апгар на первой минуте жизни составила 7-8 баллов. Для группы новорожденных с ВУП - 3 балла, а с РНП – 4 балла. Следовательно, асфиксия и результат оценки по шкале Апгар от 1 до 7 баллов на первой минуте жизни являются фактором риска развития пневмонии у новорожденных.

Таким образом, прогноз развития пневмонии у новорожденного зависит не от одного конкретного фактора риска: пола, оперативного родоразрешения, наличия хронической фетоплацентарной недостаточности, а опосредуется суммарным влиянием таких составляющих, как: ОАГА родильницы, продолжительность безводного периода более 24 часов, асфиксия при рождении новорожденного, эффективность реанимационных мероприятий в течение первых пяти минут жизни, наличие респираторной терапии с рождения [110].

Анализ клинико-рентгенологических данных внутриутробных и ранних неонатальных пневмоний у новорожденных детей выявил ряд достоверных клинико-рентгенологических различий внутриутробных и ранних неонатальных пневмоний.

Так, реакция детей на осмотр при внутриутробных пневмониях вялая - 72,5% , а при ранних неонатальных пневмониях – беспокойная 66,8 % ( $p < 0,01$ ). Защитная реакция в виде гипертермии наоборот достоверно чаще в 42,3 % ( $p < 0,001$ ) определялась при ранних неонатальных пневмониях. Достоверным проявлением внутриутробных пневмоний является акроцианоз в 92,6% ( $p < 0,05$ ), а при ранних неонатальных наблюдали центральный цианоз в 76,5 % ( $p < 0,01$ ).

Одышка с участием всей вспомогательной мускулатуры и высокой балльной оценкой дыхательной недостаточности по шкале Даунса с высокой степенью достоверности - 96,5% ( $p < 0,001$ ) преобладали при внутриутробных пневмониях. При них чаще отмечалось тахипноэ - 89,5% ( $p < 0,05$ ). Физикальные данные так же отличались. При обеих формах пневмоний чаще прослушивались ослабленное дыхание 10,5% и 31,1% соответственно ( $p > 0,05$ ), однако жесткое дыхание чаще прослушивалось при внутриутробных пневмониях 78,6% ( $p < 0,05$ ).

И в рентгенологической картине имелись различия этих двух видов пневмоний. Обширные воспалительные изменения в легких - сегментарные и 2-х сторонние очаговые в 29,8% и 28,4% соответственно ( $p < 0,001$ ) типичны для внутриутробных пневмоний, а для ранних неонатальных – двусторонние в 65,5% и левосторонние очаговые – 34,5% ( $p < 0,001$ ).

Значительное распространение хронических инфекционно-воспалительных заболеваний у женщин фертильного возраста, исходное снижение неспецифической резистентности приводят к длительной персистенции патогенных возбудителей в организме беременных и росту частоты внутриутробного инфицирования, что, в свою очередь, обуславливает срывы адаптации у новорожденных и становится причиной увеличения у них числа инфекционных осложнений. Число детей с проявлениями внутриутробной инфекции, родившихся от женщин с инфекционно-воспалительными заболеваниями, не снижается, а, наоборот, растет, составляя сегодня от 10 до 58% [29].

С учетом вышеизложенного следует отметить, что в современных условиях резко возросла частота хламидийной, вирусной, микоплазменной и смешанной инфекции, диагностика и лечение которых представляет значительные трудности в связи с особенностями возбудителей и развивающейся устойчивостью микроорганизмов к антибиотикам.

Нами было проведено комплексное исследование 180 родильниц, на наличие специфических фрагментов ИППП образцов клинического материала, выделенного из цервикального канала обследуемых женщин входящих в группу

риска с диагнозом хроническое ВУИ. Контрольную группу составили 56 женщин с физиологически протекающей беременностью.

При этом хламидии выявлялись в 18,6% случаев, микоплазмы в 21,5%, ВПГ – 25,7%, на ЦМВИ приходилось – 34,2% от процента положительных находок. ВПГ и ЦМВИ у обследованной группы женщин, занимают доминирующее положение в развитии микст-инфекций. У 132 из 180 женщин (73,3%) специфические антитела - IgG к ЦМВИ суммарно были выявлены во всех группах.

Следовательно, инфицирование плода ЦМВИ у обследованных родильниц может происходить, как за счет первичного инфицирования с высоким риском трансплацентарной передачи, так и при реактивации персистирующего вируса или суперинфекции. Данные полученные в нашем исследовании коррелируют с литературными источниками [65;66]. Практически у всех обследованных женщин (98%) отмечается высокая частота вирусно-вирусных, вирусно-бактериальных инфекций. Анализ полученных результатов, свидетельствует о том, что ЦМВИ чаще всего встречалась в виде микст – инфекции с *Chlamydomphila pneumoniae* (11,5%).

В работе нами также было проведено обследование 230 новорожденных, родившихся у родильниц с наличием ВУИ.

Частота выделения представителей аэробной микрофлоры в мазках со слизистой зева и ТБА у новорожденных высокого инфекционного риска в момент рождения составила от 38,6% (в группе клинически здоровых новорожденных) до 61,4% (у детей с тяжелыми формами ВУИ). Для тяжелых форм ВУИ была характерна высокая частота контаминации новорожденных представителями инфекций, передающихся половым путем: ВПГ-2 — 17,4%, ЦМВИ — 27%, хламидии — 25,8%, микоплазма — 29,8 %.

Известно, что среди новорожденных легочная форма, в частности ВУП, является наиболее тяжелой клинической формой ВУИ, с большим процентом осложнений и летальных исходов, в связи, с чем нами было уделено повышенное внимание изучению ТБА с данной патологией [73].

В работе нами выявлено, что в 1/3 случаев в клинике ВУИ превалировала внутриутробная пневмония ЦМВ-хламидийной (12,3%), хламидийной (14,2%) и ЦМВИ - микоплазменной этиологии (8%), что коррелирует с полученными клинико - рентгенологическими данными.

Исследования последних лет указывают на возрастающую роль в развитии бронхолегочных заболеваний у детей «атипичных» пневмотропных возбудителей, таких как *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* и др.

По клинико-морфологическим признакам эти инфекции сходны с заболеваниями, вызванными условно-патогенными микроорганизмами, но трудно диагностируются. Это определяет необходимость совершенствования клинико-лабораторной диагностики ВУИ у новорожденных, что особенно важно для быстрой расшифровки неонатальных пневмоний.

Так, например, при обследовании образцов ТБА и мазков из зева и отделяемого с ВДП у новорожденных с ВУП в первые дни исследования ДНК *M.pneumoniae* определена в 2,5% случаев, а *Cl.pneumoniae* - в 8,9%.

Анализ полученных данных показал, что ДНК изученных инфекций выявлена во всех группах, в том числе у детей без признаков ВУИ. Так, наиболее часто ДНК CMW и NSV выявлялась в группе с ВУИ чаще ( $p < 0,001$ ), чем в других группах, а ДНК *M.pneumoniae* не выявлялась в группах среди новорожденных без ВУИ и контрольной. ДНК *M.pneumoniae* выявлены в 7,8% случаев, а ДНК *Cl.pneumoniae* у 9,1% обследованных новорожденных с ВУП и с диагнозом хронической ВУИ у родильниц. В группе обследованных без признаков ВУИ ДНК *M.pneumoniae* не обнаружены ни в одной пробе, тогда как ДНК *Cl.pneumoniae* в 16,5% случаях.

Полученные данные могут свидетельствовать о том, что выявленные методом ПЦР инфекции могут быть причиной ВУП у обследованных новорожденных с лабораторно не подтвержденным диагнозом, но с типичными клиническими проявлениями легочной патологии.

Развитие ВУП, тяжесть, локализация и распространенность патологического процесса, а также исход возникшей патологии определяются

видом возбудителя, его патогенностью и тем, какими путями микроорганизмы проникли от матери к плоду.

С целью подтверждения внутриутробного характера развития пневмоний у новорожденных и дифференциации ВУП от РНП, а также для оценки санитарного состояния родильного стационара, нами было проведено санитарно-микробиологическое исследование воздуха, медицинского оборудования и изучено микробное носительство среди медицинского персонала ОРИТН.

В серии исследований нами проведена качественная и количественная (подсчет общего количества колониеобразующих единиц (КОЕ)) оценка бактериальной обсемененности воздушной среды родильного дома на присутствие санитарно-показательных микроорганизмов.

Многократное обследование воздуха (94 пробы) различных отделений родовспомогательных учреждений показало, что санитарное состояние этих типов помещений удовлетворительное, микробное число не превышает допустимые нормы.

С целью выявления этого фактора инфицирования условно-патогенной микробиотой нами было проведено бактериологическое исследование смывов, взятых с различных объектов родильного стационара.

Из изученных 62 образцов с сухих поверхностей, положительный результат дали 34 (54,8%) посева. С влажных поверхностей частота положительных посевов составила 34, из которых в 19 (55,9%) случаях выделялась грамотрицательная микрофлора, а грамположительная составила 15 (44,1%) случаев.

В нашем исследовании, по количеству положительных находок доминировали аппарат искусственного дыхания и контуры кислородной маски наркозного аппарата (23,5 и 14,7% соответственно).

Из 34 положительных находок полученных при исследовании 62 смывов с медицинского оборудования и инвентаря суммарно доминировали грамотрицательные микроорганизмы – 61,7%, тогда как на долю грамположительных микробов приходилось – 38,2% ( $p < 0,05$ ). Полученные в настоящем исследовании данные коррелируют с ранее проведенными нами

результатами санитарно-бактериологического исследования в родильном доме РКБ, а также данными литературы [97].

Так как медицинские работники являются контингентом высокого риска инфекционного заражения как условно-патогенными, так и патогенными микроорганизмами [82], нами было проведено санитарно-микробиологическое исследования медицинского персонала на носительство патогенных микроорганизмов.

Было обследовано 29 медицинских работников (врачи, средний и младший медперсонал), которые имели постоянный контакт с новорожденными.

В ходе проведения исследования было установлено, что носительство *S. aureus* наиболее было распространено среди врачей в ОРИТН – 37,5%, в родблоке и в палатах новорожденных этот показатель составил – 25%, в послеродовом отделении – 12,5%.

У медицинских сестер в ОРИТН в 33,3% случаев, у акушерок послеродового отделения в 27,7%, а у акушерок родильного блока микроорганизмы выделялись в 22,3%, несколько меньше у медсестер палат новорожденных 16,7%. Показатели носительства *S. aureus* у младшего медперсонала статистически не отличались от показателей среднего медперсонала. Показатели носительства *S. aureus* у сотрудников ОРИТН оказались выше, чем в других отделениях, что объясняет доминирующий характер выделенной флоры в этиологической структуре пневмоний у новорожденных, находящихся в ОРИТН ( $p < 0,05$ ).

Существенным фактором передачи микроорганизмов в отделениях родильного дома являются и руки медицинского персонала. С целью выявления носительства патогенной микробиоты медперсоналом ( $n = 58$ ), нами был проведен анализ, в котором изучался качественный и количественный состав микробиоты кожи рук до начала работы и в течение рабочего дня. Суммарное количество микроорганизмов колебалось в широких пределах: от 0 до  $10^{10}$  КОЕ.

В результате при бактериологическом исследовании смывов с кожи рук врачей акушеров-гинекологов высевали только культуру *S.epidermidis* в 33,3% случаев. У акушерок родильных блоков была выделена культура *S.epidermidis* в 29,2%, *E.coli* - в 12,4% случаев. При исследовании смывов с кожи рук младшего персонала видовой состав микроорганизмов представлен более широко - *S.epidermidis* была выделена в 31,6%, *E.coli* - 21%, *Proteus spp.* - в 10,5%, *P.aeruginosa* - в 5,2 % случаев.

Наши исследования подтвердили, что колонизация кожных покровов рук *S.epidermidis* является отражением защитных возможностей организма, а степень колонизации - объективным показателем предрасположенности к осложненному течению инфекции, в частности, неонатальных пневмоний.

Таким образом, по результатам проведенных бактериологических исследований можно сделать вывод, что рост удельного веса условно-патогенной микрофлоры в этиологической структуре ранних неонатальных пневмоний напрямую зависит от инфицирования кожи рук медперсонала, обсемененности аппаратуры медицинского назначения, в частности аппарат ИВЛ, которые недостаточно стерилизуются и дезинфицируются.

Для определения диагностической значимости микробиологического метода и эффективности проведенных исследований, мы провели сравнительный анализ полученных результатов.

При бактериологическом исследовании в целом в обеих группах наблюдения отмечался рост как грамположительной, так и грамотрицательной микробиоты.

Грамположительные микроорганизмы достоверно чаще ( $p < 0,05$ ) высевались при внутриутробных пневмониях (56%). А грамотрицательная микробиота с высокой степенью достоверности ( $p < 0,001$ ) чаще отмечалась при ранних неонатальных пневмониях (58,6%). В группе внутриутробных пневмоний отмечались ассоциации грамположительной и грамотрицательной микрофлоры в равных соотношениях, а в группе ранних неонатальных – преобладали

грамотрицательные микробные ассоциации. Практически идентичны данным бактериологического исследования результаты ПЦР.

Из 230 обследованных новорожденных с ВУП у 213 (87,5%) бактериологический посев был положительным. Доминирующим микроорганизмом являлся *S. epidermidis*. Из различного исследованного биологического материала от новорожденных выделено и идентифицировано до вида 414 штаммов, представителей различных таксонов. Наиболее обсемененным биотопом у новорожденных с ВУП являлся зев – 140 штаммов (33,8%), наименее, кровь – 21 (5,2%).

При этом общее количество положительных результатов бактериологических посевов клинического материала из очагов воспаления составил 64,8%. Чаще у детей были инфицированы зев - 61,3%, ТБА - 59,3% и ВДП - 52,4% ( $p < 0,05$ ). У 246 обследованных новорожденных с РНП было выделено и идентифицировано 348 штаммов в этиологически значимом количестве.

Среди выделенных микроорганизмов по частоте выделения на первом месте - *K. pneumoniae* (19,7%), на втором - *E.coli* (17,1 %) на третьем - *S.epidermidis* (15,5 %) и далее *P. aeruginosa* (11%).

Учитывая приведенные данные, а также тот факт, что вероятность возникновения инфекционных осложнений при неонатальных пневмониях возрастает для новорожденных в родильных домах, представляется целесообразным подробное изучение факторов патогенности УПМ.

В подавляющем большинстве случаев при оценке видовой принадлежности микроорганизмов, в том числе и стафилококков, опираются не только на их биохимические свойства, но и на наличие или отсутствие у них характерных факторов патогенности.

Для оценки свойств ряда выделенных микроорганизмов рода *Staphylococcus*, изолированных из различных биотопов новорожденных, мы изучили некоторые факторы патогенности, в частности, наличие лецитовителлазной и ДНКазной активности, наличие гемолитических свойств.

Все выделенные штаммы стафилококков на основании изучения их свойств идентифицированы как представители коагулазаотрицательных видов стафилококков (КОС).

Выделенные культуры *Staphylococcus spp.* обладали высокой биохимической активностью, ферментировали и окисляли с выделением кислоты (без газа) глицерин, глюкозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, маннит.

При исследовании биологических свойств выделенных штаммов микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* было выявлено, что все они обладали определенным набором факторов патогенности. У большинства регистрировали гемолитическую активность, наличие ДНК-азы и фермента лецитовителазы.

Условно-патогенные энтеробактерии рода *Kiebsiella* в последние годы привлекают внимание исследователей, так как, обладая выраженной биологической и экологической пластичностью, они могут приобретать возможность длительного существования в организме человека и являться причиной развития различных заболеваний [154]. В качестве одного из оснований этого явления рассматривают изменение патогенности этих микроорганизмов [75].

Установлено, что изменение патогенности у бактерий реализуется на генетическом уровне через мутации и генетические рекомбинации [154].

Наиболее существенными для изменения патогенности условно-патогенных энтеробактерий, ввиду «скачкообразного» характера и кардинальности происходящих превращений микроорганизма, рассматривают генетические рекомбинации, которые определяют геномную пластичность *Enterobacteriaceae*, реализуемую через несколько конкретных механизмов, связанных, в частности, с «островами» и «островками» патогенности [75].

Нами было обнаружено, по меньшей мере, 78 серотипов (К антиген, капсульный) для *K. pneumoniae*. Несколько серотипов (включая преобладающие К<sub>1</sub> и К<sub>2</sub>) обладают уникальным гиперслизистым (гипервирулентным) фенотипом вследствие повышенной продукции капсульного полисахарида (КПС), который

считается главным фактором вирулентности *K. pneumoniae* и определяется по наличию гиперслизистых колоний на чашке Петри. Степень слизистости положительно коррелирует с инвазивностью инфекционного агента. Однако связь гипервирулентных штаммов с гиперпродукцией капсулы остается под вопросом, поскольку повышенное содержание полисахаридов может быть следствием включения полисахаридов из внешней среды, а не полисахаридов «истинного происхождения».

Гипервирулентные штаммы *K. pneumoniae* являются высоко инвазивными и могут поражать даже здоровых индивидов, приводя к развитию внутрибольничных жизнеугрожающих инфекций, таких как пиогенный абсцесс печени, менингит, некротизирующий фасциит, эндофтальмит и тяжелая пневмония. В частности, K1/K2-вызванный абсцесс печени часто осложняется метастатическим распространением инфекции. Эта особенность является характерной для гиперслизистых штаммов *K. pneumoniae* и не присуща другим грамотрицательным бактериям.

На данный момент не опубликовано полноценного обзора патогенеза *K. pneumoniae* на молекулярном уровне. Данный обзор содержит информацию о детерминантах вирулентности *K. pneumoniae* и, в особенности, гипервирулентных штаммов.

На основании вышеизложенного, следует констатировать, что при неонатальных пневмониях в этиологической структуре выявляется как грамположительная, так и грамотрицательная микробиота. Однако достоверно чаще грамположительная отмечается при внутриутробных пневмониях ( $p < 0,001$ ). А при ранних приобретенных пневмониях с высокой степенью достоверности преобладает грамотрицательная флора ( $p < 0,001$ ). Имеются значимые различия и в штаммах исследованных микробов. При внутриутробных пневмониях высевается чаще *S. epidermidis*, а при ранних неонатальных – *K.pneumoniae*.

В эпидемиологическом надзоре за состоянием инфекционно-воспалительной заболеваемости большое значение имеет мониторинг за

селекцией и распространением антибиотикорезистентных штаммов, накопление информации о региональных особенностях антибиотикорезистентности возбудителей неонатальных пневмоний.

В связи с существованием региональных отличий в уровне резистентности возбудителей неонатальных пневмоний к антимикробным препаратам крайне важной задачей является проведение локального мониторинга.

Нами проведен анализ резистентности основных возбудителей неонатальных пневмоний к антибактериальным препаратам. Было протестировано 654 штамма микроорганизмов, в том числе ведущие этиотропные патогены: *S.epidermidis* - 28,6% ; *K. pneumoniae* – 26,3%; *E. coli* –14,2%; *A. baumannii* – 8,2%; *S. aureus* –7,3%; *Enterococcus spp.* – 5,8%; *P. aeruginosa* – 5,6%; *Enterobacter* – 4%.

Наибольшая резистентность выявлена у возбудителей неонатальных пневмоний к пенициллинам (Оксациллин, Амоксициллин) – 46,2%; фторхинолонам (Ципрофлоксацин, Ломефлоксацин)– 43,4%; аминогликозидам (Гентамицин, Тобрамицин) – 32,9%; цефалоспорином 3-го поколения (Цефиксим, Цефотаксим)– 27,2% и к цефалоспорином 4-го поколения (Цефепим) – 16,8%. Незначительная устойчивость определялась к цефалоспорином 2-го поколения (Цефуросим, Цефокситим) – 11%; макролидам (Азитромицин, Кларитромицин) – 8,3%; цефалоспорином 1-го поколения (Цефазолин, Цефтазидим) – 8%, Амоксиклаву – 4,8%, к монобактамам (Азтреонам) - 2,5% и карбапенемам (Меропенем, Имипенем) - 1,5%.

Штаммы *S.aureus* были устойчивы к пенициллинам (50,6%); фторхинолонам - 23% штаммов; аминогликозидам - 29%; проявляли резистентность к цефалоспорином 1 и 3-го поколения - 4,3% - 5,2% штаммов соответственно. К макролидам были устойчивы - 41,2% штаммов; к амоксиклаву – 4,4; карбапенемам - 3,2% выделенных штаммов.

Схожая ситуация складывалась с резистентностью к антибиотикам штаммов *S.epidermidis*. Отмечалась высокая устойчивость к пенициллинам - 48,6% штаммов; аминогликозидам - 28,7% штаммов; фторхинолонам - 24,2% штаммов.

Штаммы *Enterococcus spp.* проявляли наибольшую устойчивость также к пенициллинам (34,8%); аминогликозидам в 33,5% и к фторхинолонам - 22,8% штаммов.

Анализ антибиотикорезистентности основных грамположительных патогенов выявил некоторые закономерности и позволяет использовать для этиотропной терапии неонатальных пневмоний, в частности ВУП, широкий спектр антибактериальных препаратов, за исключением препаратов пенициллинового ряда, высокая резистентность к которым *S. aureus* обусловлена продукцией БЛРС.

Для определения тактики этиотропной антибактериальной терапии и разработки эмпирической терапии с учетом региональных особенностей, был проанализирован уровень резистентности к антибактериальным препаратам грамотрицательных бактерий, возбудителей неонатальных пневмоний.

Характеризуя антибиотикорезистентность основных грамотрицательных возбудителей неонатальных пневмоний, необходимо отметить высокую резистентность *K. pneumoniae* к фторхинолонам – 52,2%; аминогликозидам – 51,6%; пенициллинам – 49,8%; цефалоспорином 3-го поколения – 29,8%. Практически отсутствует устойчивость к макролидам – 1,7%. Не выявлено штаммов *K. pneumoniae* устойчивых к монобактамам.

Штаммы *E. coli* проявляли наибольшую устойчивость к пенициллинам – 40,2%; фторхинолонам – 36,6%; аминогликозидам – 32,2%; цефалоспорином 3-го поколения – 29,8%. Почти отсутствует устойчивость к макролидам – 1,2%. Не выявлено штаммов *E. coli*, устойчивых к монобактамам и цефалоспорином 2-го поколения.

Штаммы *A. baumannii* были устойчивы к фторхинолонам – 62,8%; аминогликозидам – 58,3%; пенициллинам – 45,3%; цефалоспорином 3-го поколения – 49,7%; цефалоспорином 4-го поколения – 39,8%. Практически не отмечается резистентности к амоксиклаву – 1,2%.

Необходимо отметить значительную устойчивость *P. aeruginosa* к фторхинолонам в 56% случаев; аминогликозидам – в 43,2%; цефалоспорином 3-го

поколения – в 39%; карбапенемам – в 32%; цефалоспорином 4-го поколения – 26,2%. Отсутствует резистентность выделенных штаммов *P. aeruginosa* к макролидам и амоксиклаву.

Таким образом, полученные нами данные позволяют рекомендовать для проведения этиотропной терапии цефалоспорины 2-го поколения, или карбапенемы в виде монотерапии. В более тяжелых ситуациях можно рекомендовать комбинации макролидов с монобактамами и амоксиклавом.

Предрасположенность новорожденных к возникновению инфекционных осложнений может быть обусловлена не только особенностями госпитальных штаммов микроорганизмов, но и состоянием иммунной системы новорожденных детей.

Для успешной борьбы с пневмониями новорожденных требуется знание не только клинико-микробиологических, но и иммунологических особенностей данной патологии. В связи с этим одной из задач данной работы являлось изучение микробиоты и факторов врожденного иммунитета (*TLR2*, *TLR4*, *HBD-1*, *HBD-2*, *TNF $\alpha$*  и *NF- $\kappa$ B*) на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей при внутриутробном инфицировании плода и развития ранней неонатальной пневмонии.

Нами проведено изучение микрофлоры и факторов врожденного иммунитета (*TLR2*, *TLR4*, *HBD-1*, *HBD-2*, *TNF $\alpha$*  и *NF- $\kappa$ B*) на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей при внутриутробном инфицировании плода и пневмонии новорожденных.

Нами было показано, что 181 ген имеет отношение к пневмонии, и все они вовлечены в активацию иммунной системы и воспалительный ответ.

В работе исследовали экспрессию генов *TLR2* и *TLR4*, участвующих в распознавании большинства бактерий, с которыми “сталкивается” иммунная система в первые дни жизни ребенка. Также провели оценку экспрессии гена транскрипционного фактора *NF- $\kappa$ B*, который активирует экспрессию генов эффекторных молекул врожденного иммунитета. Эти факторы, в свою очередь,

приводят к развитию воспалительных реакций в ответ на проникновение патогена.

Другие молекулы, исследуемые в работе: цитокин *TNF $\alpha$*  и противомикробные пептиды *HBD-1* и *HBD-2*. *TNF $\alpha$*  это противовоспалительный цитокин, который участвует в развитии воспаления при проникновении патогена. *HBD-1* и *HBD-2* – противомикробные пептиды, которые относятся к дефенсинам, причем *HBD-1* экспрессируется конститутивно и его уровень часто генетически-опосредован, а *HBD-2* является индуцибельным пептидом.

Нами было показано, что в эпителиальных клетках верхних отделах респираторного тракта здоровых новорожденных экспрессируются *TLRs*. В группе здоровых новорожденных в эпителиальных клетках слизистой респираторного тракта уровень экспрессии генов *TLR2* составил –  $149,7 \times 10^3$  копий исследуемого гена относительно экспрессии гена актина, *TLR4* –  $0,8 \times 10^3$  копий исследуемого гена относительно экспрессии гена актина.

Экспрессия *TLR2* была сопоставима с показателями у детей других возрастных категорий, в то время как показатель *TLR4* – был достоверно выше на порядок [23; 25]. В подтверждение данной теории можно представить данные по экспрессии рецепторов *TLR2* и *TLR4* у здоровых новорожденных, у которых определены в верхних дыхательных путях возбудители (*E.coli*, *Acinetobacter*, *P.aeruginosa*, *Citribacter* и др.).

При этом следует отметить, что инфекционной патологии (пневмонии и др.) у этих новорожденных не было выявлено. В группе здоровых новорожденных с возбудителями в эпителиальных клетках слизистой респираторного тракта уровень экспрессии генов *TLR2* составил –  $379,9 \times 10^3$  копий исследуемого гена относительно экспрессии гена актина, *TLR4* –  $0,6 \times 10^3$  копий исследуемого гена относительно экспрессии гена актина.

Таким образом, мы можем говорить о достоверном увеличении показателя *TLR2* в 2,53 раза относительно такового в группе здоровых новорожденных, у которых инфекции не выявлялись. Активация рецепторов врожденного иммунитета может приводить к запуску сигнального пути через NF $\kappa$ B и к

выработке противомикробных пептидов (*HBD-2* и др.) и провоспалительных цитокинов (к примеру, *TNF $\alpha$*  и др.).

Уровень экспрессии ядерного фактора *NF $\kappa$ B* в группе здоровых новорожденных составил  $5,17 \times 10^3$  копий исследуемого гена относительно экспрессии гена актина, а в группе новорожденных с детектируемым инфекционным возбудителем (без патологии) –  $10,86 \times 10^3$  копий исследуемого гена относительно экспрессии гена актина, что в 2,1 раза выше, чем в группе сравнения. Данный показатель может свидетельствовать об активации классического сигнального пути с рецепторов *TLR*.

Известно, что экспрессия  $\beta$ -дефенсинов в респираторном тракте приобретает особое значение у новорожденных, так как эти пептиды способствуют защите плода от инфекции. [85]. Имеются единичные работы по экспрессии гена *HBD-1* и *HBD-2* в респираторном тракте у детей [5].

В связи с этим, одной из задач работы явилось изучение экспрессии генов *HBD-1* и *HBD-2* в эпителиальных клетках слизистой верхних отделов респираторного тракта у здоровых новорожденных.

Были определены фоновые показатели экспрессии генов *HBD-1* и *HBD-2*, которые составили 7,6 и 39,7 ( $\times 10^3$  копий исследуемого гена относительно экспрессии гена актина), соответственно.

В группе здоровых новорожденных с выявленным патогеном данные показатели были значительно выше и составили 14,9 и 182,2 ( $\times 10^3$  копий исследуемого гена относительно экспрессии гена актина), соответственно. Можно утверждать, что наличие патогена в респираторном тракте у новорожденных ведет к активации экспрессии противомикробных пептидов: *HBD-1* – в 1,9 раз и *HBD-2* – в 4,6 раз.

При этом уровень эффекторной молекулы *TNF $\alpha$*  также возрастал в 2,3 раза.

Суммируя полученные данные можно заключить, что в эпителиальных клетках респираторного тракта здоровых новорожденных на фоновом уровне экспрессируются исследуемые показатели врожденного иммунитета, а наличие патогена в большинстве случаев приводит к активации экспрессии этих факторов.

Механизмы активации связаны с взаимодействием лигандов (компонентов патогенов) с *TLRs*. В случае если врожденный иммунитет на уровне слизистой оболочки респираторного тракта новорожденного адекватно реагирует на патоген, в таком случае, не наблюдается какого-то патологического процесса.

В работе нами было проведено исследование экспрессии факторов врожденного иммунитета клетками слизистой респираторного тракта новорожденных с пневмонией.

У новорожденных с ВУП выявлено умеренное снижение показателя *TLR2* и резкое угнетение экспрессии гена *TLR4* в 2,24 раза. Показатели дефенсинов при этом практически не отличались от нормы.

У пациентов с РНП также наблюдалось небольшое снижение экспрессии гена *TLR2* в 1,5 раз и *TLR4* – в 1,75 раз. При этом у новорожденных с пневмонией наблюдался четкий рост уровня экспрессии гена провоспалительного цитокина *TNF $\alpha$*  и ядерного фактора *NF- $\kappa$ B*, что может свидетельствовать об активации воспалительных реакций на уровне слизистых оболочек. Следует отметить, что данная активация происходит на фоне супрессии экспрессии генов рецепторов.

В группе здоровых новорожденных выявлена положительная ассоциация экспрессии *TLR2* и *HBD-1*, *TLR2* и *HBD-2*, *HBD-1* и *HBD-2* (при этом коэффициент составил 0,734, 0,734, 0,781, соответственно).

В группе новорожденных с ВУП была определена аналогичная зависимость. А в группе с РНП корреляция показателей была иной - *HBD-1* и *HBD-2* (коэффициент 0,918). Также была найдена слабая обратная зависимость между *TLR4* и *HBD-2*.

Нами проведено изучение микробиоты и факторов врожденного иммунитета (*TLR2*, *TLR4*, *HBD-1*, *HBD-2*, *TNF $\alpha$*  и *NF- $\kappa$ B*) на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей при внутриутробном инфицировании плода и пневмонии новорожденных.

Показатели врожденного иммунитета – Toll подобные рецепторы (*TLR2*, *TLR4*) – экспрессировались на эпителиальных клетках верхних дыхательных путей как у новорожденных с ВУП, так и у детей с РНП. Следует отметить, что у

новорожденных с ВУП уровни экспрессии распознающих структур были достоверно снижены в два раза, этот факт можно объяснить как генетическими особенностями организма ребенка, так и активностью факторов патогенности микроорганизмов.

Для подтверждения последней гипотезы был проведен анализ ассоциации показателей врожденного иммунитета и наличием определенного возбудителя. Были выделены подгруппы детей с пневмониями, вызванными *K.pneumonia*, *P.aeruginosa*, *E.coli*, кокковой флорой и смешанной инфекцией.

Показано, что экспрессия гена *TLR2* снижалась в 6,2 раза у пациентов с *K.pneumonia* и в два раза и более при смешанной инфекции. Уровни экспрессии гена *TLR4* были снижены более чем в три раза при инфекции, вызванной *E.coli*.

Кроме того, нами были также определены уровни экспрессии генов *HBD-1* и *HBD-2* в эпителиальных клетках верхних дыхательных путей в группах новорожденных с ВУП, с РНП и у здоровых детей.

Известно, что дефенсины осуществляют защиту слизистых от инфекционных возбудителей. *HBD-1* постоянно вырабатывается на уровне слизистой верхних дыхательных путей, а *HBD-2* – индуцибельно, т.е. под действием инфекционных патогенов.

Показано, что экспрессия гена *HBD-2* увеличивается в 2,3 раза у новорожденных, у которых определяется инфекционный возбудитель, но при этом отсутствуют клинические проявления пневмонии. Также показано достоверное снижение показателя *HBD-2* (в 3,2 раза) у пациентов с пневмонией, вызванной *K. pneumonia*.

Помимо дефенсинов, был проведен анализ экспрессии генов провоспалительного цитокина *TNF $\alpha$*  и фактора транскрипции *NF- $\kappa$ B* в эпителиальных клетках верхних дыхательных путей в исследуемых группах. Данные молекулы участвуют в сигнальном пути с *TLRs*. Так, было показано, что у детей, у которых выявляли инфекционные возбудители, но не было клинических проявлений, показатель цитокина возрастал более чем в два раза.

Иммунологические показатели (распознающие структуры – *TLR2*, *TLR4*, дефенсины *HBD-1*, *HBD-2*, провоспалительный цитокин *TNF $\alpha$*  и фактор транскрипции *NF-kB*) у новорожденных с внутриутробным инфицированием и с пневмонией изменяются неоднозначно. Выявлена тенденция к снижению экспрессии генов *TLR2*, *TLR4* и увеличению экспрессии генов *TNF $\alpha$*  и *NF-kB*. Данные изменения коррелируют с инфекционным возбудителем, следовательно, можно предположить, что непосредственно возбудитель за счет действия факторов патогенности влияет на показатели врожденного иммунитета.

Таким образом, было выявлено наличие ассоциации полиморфных аллелей в генах *IL-10* (*A(-1082)G*) и *TNF* (*G4682A*) с инфекционной патологией плода и новорожденного.

В последнее время доказана роль наследственных факторов в интенсивности реализации механизмов врожденного иммунитета. Генетическая предрасположенность к развитию ВУП и РНП связана с наследованием определенных аллелей и генотипов.

В данной работе мы выбрали ряд факторов врожденного иммунитета, которые по данным биоинформационного анализа и по результатам экспрессионного профиля имеют большое значение в защите организма при неонатальных пневмониях. Все они являются компонентами *TLR*-опосредованного пути.

Полиморфный маркер, который мы исследовали в работе, локализуется в нетранслируемой 5'-области гена *DEFB1* (кодирующего белок  $\beta$ -дефенсин-1 человека). И изменения его состояния могут напрямую влиять на количество экспрессируемого белка. Следовательно, можно говорить о генетически-опосредованной регуляции количества дефенсина на уровне слизистых оболочек.

Также нами были исследованы полиморфизмы в генах как про-, так и противовоспалительных цитокинов. Во-первых, доказан факт участия цитокинов в защитных механизмах против возбудителей пневмонии. Во-вторых, выявлен полиморфизм цитокиновых генов, как в области экзонов, кодирующих

функциональную область молекулы, так и в интронах, влияющих на эффективность экспрессии цитокина.

Таким образом, активность и количество одного и того же цитокина могут быть различными в зависимости от генетических вариаций.

При изучении распределения аллелей и генотипов полиморфного маркера *Arg753Gln* гена *TLR2* среди родильниц, у которых родились дети с ВУП и РНП, а также в группе родильниц с физиологически протекавшей беременностью и без патологии плода обнаружено преобладание частоты аллеля *Arg* над частотой аллеля *Gln*, и встречаемость генотипа *ArgArg* над встречаемостью генотипов *ArgGln* и *GlnGln* во всех исследуемых группах (у родильниц). Отличия распределения аллелей и генотипов между группами были недостоверны.

В нашей работе также исследовалось распределение аллелей и генотипов полиморфного маркера *Arg753Gln* гена *TLR2* у новорожденных с ВУП и РНП. Частота аллеля *Arg* была значительно выше аллеля *Gln* и варьировала в диапазоне 0,86 - 0,95 (частота аллеля *Gln* варьировала в диапазоне 0,05 - 0,14). Следует отметить, что частота гетерозиготного генотипа была выше, чем в аналогичной группе родильниц. А генотип *GlnGln* отсутствовал в исследуемых нами группах новорожденных.

Таким образом, можно заключить, что полиморфный маркер *Arg753Gln* гена *TLR2* не связан с внутриутробным инфицированием плода, а также с пневмонией новорожденных. Можно предположить, что хотя замена аминокислоты в 753 положении могла привести к изменению передачи сигнала с TIR-домена *TLR2* рецептора, но в наших исследованиях это изменение не было критично для реализации патологии новорожденных.

Другой, исследуемый нами генетический маркер, локализовался в кодирующей области гена *TLR4* и реализовался через замену аминокислоты *Asp* на *Gly* в 299 положении.

Нами показано, что и у родильниц, и у новорожденных доминировал аллель *Asp* и генотип *AspAsp* как в группе сравнения, так и в опытных группах. Было выявлено, что у родильниц аллель *Gly* и генотип *GlyGly* ассоциированы с

развитием внутриутробного инфицирования плода. Частота аллеля *Gly* при этом составляет 0,11, а генотипа - 0,09, в группе сравнения частота аллеля - 0,02, а генотип не определяется. У новорожденных аллель (частота 0,08) ассоциирована с внутриутробной инфекцией, а также генотип *AspGly* (частота 0,17). При этом в группе сравнения данный маркер не определялся.

Таким образом, в дагестанской популяции нами был определен маркер в гене *TLR4*, который ассоциирован с ВУП (как аллели, так и генотипы). Однако, анализируя результаты русской популяции (на территории г. Москвы) можно сказать, что данный маркер не имеет подобной ассоциации [24].

Можно сделать заключение, что представленные маркеры могут быть использованы сугубо на региональном уровне.

Далее нами был проведен поиск других полиморфных маркеров в генах сигнальных рецепторов врожденного иммунитета, которые могут быть ассоциированы с риском развития преждевременных родов или с реализацией внутриутробной инфекции.

В данном исследовании нами был выбран полиморфный маркер *G(-20)A* гена *DEFB1*, расположенный в нетранслируемой области. Предположительно этот SNPs может влиять на уровень экспрессии гена дефенсина.

Анализ частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *G(-20)A* у родильниц в исследуемых группах выявил некоторые достоверные различия. Так, частоты аллелей данного маркера в группе с внутриутробным инфицированием плода и в группе сравнения были следующими: аллель *G* - 0,66, 0,79, аллель *A* - 0,34, 0,21, соответственно. Частота аллелей у родильниц, у которых родились новорожденные с ВУП, достоверно не отличались от таковых в группе сравнения. Таким образом, аллель *A* (определяемая у родильниц) является маркером ВУП.

Частоты генотипов исследуемого маркера у родильниц в группе ВУП, РНП и группе сравнения были следующими: *GG* - 0,78, 0,58, 0,58; *AA* - 0, 0,25, 0; *AG* - 0,22, 0,17, 0,42, соответственно. Показано, что в дагестанской популяции доминировал аллель *G* и генотип *GG* (частота составляла более 0,58). Было

выявлено, что риск развития внутриутробного инфицирования плода ассоциирован с генотипом *AA* у родильниц, а генотип *AG* – является «протективным».

У новорожденных также проводили исследование ассоциации маркера *G(-20)A* гена *DEFB1* с риском развития ВУП и РНП. Среди аллелей доминировал аллель *G* (частота была выше 0,73 во всех группах) и генотип *GG* (частота превышала 0,52). Такая же тенденция была определена и у родильниц. Однако ассоциаций аллелей и генотипов маркера *G(-20)A* у новорожденных с патологией не было выявлено.

Полученные результаты указывают на то, что генетический маркер *G(-20)A* гена *DEFB1* ассоциирован с риском развития ВУП у новорожденного.

В данном исследовании было выбрано три цитокина: *IL-10*, *IL-17* и *TNF $\alpha$* , генетические маркеры, которые могут быть ассоциированы с риском развития пневмонии.

Помимо провоспалительных цитокинов в работе также был исследован противовоспалительный цитокин - *IL-10*. Нами был проведен сравнительный анализ распределения аллелей и генотипов полиморфных маркеров *TNFA (-308 G/A)* и *IL17A (-197 G/A)*, которые локализованы в промоторных областях генов. Часто изменения последовательности ДНК в промоторной области гена связано с изменением экспрессии белка.

Во всех группах доминировал аллель *A* и гетерозиготный генотип. При этом достоверных различий между частотами аллелей и генотипов в группах с пневмонией новорожденных, внутриутробным инфицированием и группой сравнения в материале от родильниц выявлено не было.

Иная тенденция наблюдалась непосредственно у новорожденных. Аллели в материале от новорожденных во всех группах распределились приблизительно одинаково.

В группе новорожденных с пневмонией определяли достоверное увеличение частоты генотипа *GG*, которая составляла 0,18 относительно 0,04 – в группе сравнения.

Таким образом, маркер *GG TNFA (-308 G/A)* ассоциирован с риском развития пневмонии у новорожденных и может быть использован в практике. Вероятно, наличие данной замены в геноме новорожденных может быть связано с нарушением баланса выработки  $TNF\alpha$  и нарушением защиты.

Другой провоспалительный цитокин, который был исследован в работе - *IL17*. В клиническом материале от родильниц распределение частот аллелей среди исследуемых групп было следующее: аллель *A* – 0,26; 0,31 и 0,34, аллель *G* – 0,74; 0,69 и 0,66 в группах сравнения, ВУП и РНП, соответственно. Достоверных различий при этом не было определено. При исследовании частот генотипов было выявлено два маркера – генотип *GG* был ассоциирован с отсутствием развития внутриутробной инфекции, т.е. можно считать его «протективным». В то же время наличие генотипа *GA* ассоциировано с развитием инфекции у плода. Можно предположить, что нарушение экспрессии цитокина *IL17* у родильницы может служить причиной инфицирования плода.

На следующем этапе были исследованы полиморфные маркеры (*-1082A>G*) и (*-592A>C*) в гене *IL10*. Как уже говорилось ранее, *IL10* – противовоспалительный цитокин и изменения в его промоутерной области могут привести к изменению экспрессии белка и к нарушению баланса про- и противовоспалительных цитокинов.

Во всех исследуемых группах определялись аллели полиморфного маркера *IL10 (-1082 A>G)*, но достоверных изменений в распределении не было обнаружено. У родильниц выявлено, что генотип *GA* (частота которого составила 0,75, относительно 0,47 – в группе сравнения) ассоциирован с развитием пневмонии у новорожденных. При этом генотип *AA* – является “протективным”.

Частота генотипа *GG* составляет 0,09 (относительно 0,28 в группе сравнений у родильниц) и 0,07 (относительно 0,19 в группе сравнения у новорожденных).

При оценке распределения аллелей и генотипов полиморфного маркера (*-592A>C*) в гене *IL10* было показано следующее. У родильниц не было определено

достоверных ассоциаций частот аллелей и генотипов с внутриутробной патологией плода (ВУП) и новорожденных (РНП).

У новорожденных были найдены две ассоциации: генотип *GA* - «протективный» маркер развития внутриутробного инфицирования плода (частота составляла 0,20 относительно 0,42 в группе сравнения), маркер *GG* - ассоциация с риском развития ВУП (частота составляла 0,80 относительно 0,58 в группе сравнения).

На следующем этапе нами проводился поиск ассоциаций гаплотипов в генах *TNFA* и *IL-10* с ранней неонатальной пневмонией и внутриутробной инфекцией. Известно, что однонуклеотидные полиморфные маркеры могут оказывать существенное влияние на предрасположенность индивидуума к той или иной патологии, однако гораздо большее значение имеет совокупность сцепленных генов на одной хромосоме. Поэтому, помимо исследования связи между однонуклеотидными полиморфизмами *G-308A* и *G4682A* в гене *TNFA* и *A-1082G* и *A-592C* в гене *IL-10* и патологиями плода, мы провели гаплотипный анализ.

Сначала был проведен анализ гаплотипов в гене *TNFA* среди родильниц с внутриутробной инфекцией у плода, ранней неонатальной пневмонией и контрольной группой. В исследуемых выборках из девяти возможных вариантов гаплотипов встречалось только семь.

Статистически значимые различия были установлены между группой с ранними неонатальными пневмониями и контролем.

Гаплотип *GAGG* достоверно чаще встречался при патологии, чем в группе здоровых женщин (0,400 и 0,177, OR = 3,  $p \leq 0,01$ ). В гене *IL-10* был проведен анализ шести гаплотипов, остальные три варианта гаплотипов в исследуемых выборках не встречались.

При проведении сравнительного анализа распределения гаплотипов между группой с ранней неонатальной пневмонией и контрольной группой, выявили достоверно повышенную частоту гаплотипа *AGCC* в гене *IL-10* (0,455 и 0,185, OR = 3,7,  $p \leq 0,05$ ). Статистических различий между ранней неонатальной

пневмонией и группой сравнения у родильниц при анализе гаплотипов в гене *IL-10* выявлено не было.

Помимо анализа гаплотипов в генах *TNFA* и *IL-10* родильниц исследование было также проведено непосредственно среди новорожденных с ранней неонатальной пневмонией и внутриутробной инфекцией. В гене *TNFA* из девяти возможных вариантов гаплотипов у новорожденных встречались только четыре, причем во всех исследуемых группах преимущественно встречался гаплотип *GGGG*.

Таким образом, сравнительный анализ распределений гаплотипов в гене *TNFA* у новорожденных не выявил достоверных различий в группах с ранней неонатальной пневмонией и внутриутробной инфекцией по сравнению с контрольной группой. Статистически значимые различия при исследовании гаплотипов в гене *IL-10* также не были выявлены.

## ВЫВОДЫ

1. Определены критерии прогнозирования пневмоний у новорожденных и определены факторы риска: отягощенный акушерский анамнез, мужской пол ребенка, недоношенность, асфиксия. Достоверными клинико-рентгенологическими отличиями внутриутробных пневмоний от ранних неонатальных являлись: тяжелое течение, обширные воспалительные изменения в легких (сегментарные, долевыe) ( $p < 0,001$ ).
2. Установлено, что в этиологической структуре внутриутробных пневмоний у новорожденных доминировала грамположительная микробиота – коагулазоотрицательные стафилококки и энтерококки ( $p < 0,001$ ). Грамотрицательная микробиота, представленная клостриеллами, кишечной палочкой, псевдомонадами, ацинетобактерами, этиологически значима для ранних неонатальных пневмоний.
3. Показана ассоциация между заболеваемостью новорожденных неонатальными пневмониями и резистентностью к антибактериальным препаратам, что свидетельствовало о возможности формирования в ОРИТН «госпитальных» штаммов, которые вызывали инфекционные осложнения.
4. Рост удельного веса условно-патогенной микрофлоры в этиологической структуре ранних неонатальных пневмоний напрямую зависит от инфицирования кожи рук медперсонала и обсемененности аппаратуры медицинского назначения.
5. С использованием метода биоинформационного анализа построены схемы сигнальных путей, в которых описаны гипотетические молекулярные механизмы развития пневмонии новорожденных. С целью дальнейшего молекулярно-генетического анализа были отобраны гены *TLR2*, *TLR4*, *DEFB1*, *IL10*, *IL17*, *TNFA* и *NF-kB*.
6. Выявлен дисбаланс факторов врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей у новорожденных с неонатальной пневмонией. Показано, что снижение экспрессии генов рецепторов врожденного иммунитета (*TLR2*, *TLR4*) и увеличение экспрессии генов *TNFA* и *NF-kB* коррелировало с выявлением *K. pneumoniae*.

7. Найдена ассоциация полиморфных маркеров в генах *IL-17*, *DEFB1*, *TLR4* с риском развития внутриутробной пневмонии. Показано, что генотип *AG* (ген *IL10* -1082 *A>G*) и *GG* (*TNF $\alpha$*  -308 *G>A*) ассоциированы с риском развития неонатальных пневмоний.
8. Разработан алгоритм диагностики неонатальных пневмоний на основе комплекса клинико-рентгенологических, микробиологических и иммунологических данных, которые позволяют выбрать и оптимизировать адекватную и рациональную этиотропную терапию.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

### 1. В целях уточнения этиологии пневмонии

1.1. Оптимальным для диагностики неонатальных пневмоний является использование метода ПЦР в режиме реального времени в качестве скрининга предполагаемого возбудителя с параллельной микробиологической идентификацией микроорганизма и определением его чувствительности к антибиотикам.

### 2. В целях оптимизации лечения пневмонии у новорожденных

2.1. В качестве этиотропной терапии при тяжелом течении внутриутробных и ранних неонатальных пневмоний рекомендуется использовать цефалоспорины 1 и 2 поколения (Цефазолин, Цефутоксим) в сочетании с карбапенемами (Меропенем)

3. Алгоритм диагностики внутриутробных и ранних неонатальных пневмоний

3.1. Использовать дифференциально-диагностические критерии, включающие клинические и рентгенологические признаки, приведенные в соответствии с их частотой и характером влияния на патологические процессы

### 4. В целях прогнозирования и профилактики пневмоний у новорожденных

4.1. Использовать в качестве предиктора вероятности возникновения неонатальных пневмоний молекулярно-генетические методы исследования врожденного иммунитета.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

- ВДП** – верхние дыхательные пути
- ВУП** – внутриутробная пневмония
- ВУИ** – внутриутробное инфицирование
- ГВЗ** – гнойно-воспалительные заболевания
- ДН** - дыхательная недостаточность
- ЗВУР** – задержка внутриутробного развития
- ИВЛ** - искусственная вентиляция легких
- ИППП** – инфекции, передаваемые половым путем
- НП** – неонатальная пневмония
- ОРИТ** – отделение реанимации и интенсивной терапии
- ПАМП** – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны
- ПЦР** – полимеразная цепная реакция
- ПЦР-РВ** – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
- РД РКБ** – родильный дом Республиканской клинической больницы
- РНП** – ранняя неонатальная пневмония
- РДС** - респираторный дистресс-синдром
- ТБА** - трахеобронхиальный аспират
- BD-2** – beta defensin-2 (бета дефенсин 2)
- CD** – cluster of differentiation (кластер дифференцировки)
- hBD** – human  $\beta$ -defensin (бета дефенсин человека)
- hD** – human defensin (дефенсин человека)
- HLA** – human leucocyte antigens (лейкоцитарные антигены человека)
- hNP** – human neutrophil protein (человеческий нейтрофильный пептид)
- Ig** – immunoglobulin (иммуноглобулин)
- IL** – interleukin (интерлейкин)
- МНС** – major histocompatibility complex (главный комплекс гистосовместимости)
- TLR** - Toll-like receptor (Toll-подобный рецептор)

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдуллаева, Е. С. Обоснование иммуностропной терапии при внутриутробной пневмонии у новорожденных детей/ Е. С. Абдуллаева // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2009. – № 4. – С.28–31.
2. Алдашева, Н. М. Оценка факторов риска врожденных пороков развития / Н. М. Алдашева // Педиатрия. – 2010. – Т. 89, № 1. – С. 43.
3. Алексеев, В. П. Этиология и клиничко-патогенетические варианты осложненных форм острых бронхолегочных заболеваний у детей : автореф. дис... д-ра мед. наук : 14.00.09 / В. П. Алексеев. – Бишкек, 2001. – 39 с.
4. Альбицкий, В. Ю. Состояние здоровья детей первого года жизни из семей мигрантов/ В. Ю. Альбицкий, Н. Д. Одинаева, Н. В. Нечаева // Вопросы современной педиатрии. – 2006 – Т 5, № 4. – С.5–7.
5. Анализ экспрессии генов TLRs и асоциации полиморфизмов гена *DEFB1* у детей с бронхиальной астмой / М. А. Зайцева, Б. Г. Брагвадзе, О. А. Свитич, Л. С. Намазова-Баранова, Л. В. Ганковская // Вестник РГМУ. – 2016. –№ 3. – С.43-47.
6. Антибактериальная терапия пневмонии у детей/ В. К. Таточенко, Е. В. Середа, А. М. Федоров, Л. К. Катосова // Клиническая микробиология и антибактериальная химиотерапия. – 2000. - Т.2, №1. – С.77–87.
7. Антибиотикотерапия пневмоний у детей/ В. К. Таточенко, Е. В.Середа, А. М. Федоров [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 2000. – Т. 45, № 5. – С. 33–40.
8. Атауллаханов, Р.И. Иммуитет и инфекция: динамичное противостояние живых систем / Р.И.Атауллаханов, А.Л. Гинцбург // Детские инфекции. 2005. Т.4. №1. С.11-21.
9. Афиногенова, А.Г. Микробные биопленки ран: состояние вопроса / А.Г. Афиногенова, Е.Н. Даровская // Травматология и ортопедия России. – 2011. – № 3 (61). – С. 119–125.
10. Баранов, А.А. Состояние здоровья детей в Российской федерации / А. А. Баранов // Педиатрия. – 2012. – 91. – № 3. – С. 9–14.

11. Белобородова, Н. В. Оптимизация антибактериальной терапии в педиатрии – современные тенденции / Н. В. Белобородова // Русский медицинский журнал. – 1997. – Т. 5, № 24. – С. 1597–1601.
12. Бирюкова, Т. В. Неонатальные пневмонии и респираторный дистресс-синдром: клинико-микробиологические аспекты / Т. В. Бирюкова, В. А. Гриценко, И. Н. Воропаева // V Российский конгресс «Педиатрическая анестезиология и интенсивная терапия». – М., 2009. – С. 79.
13. Боконбаева, С. Дж. Этиологическая структура врожденных пневмоний / С. Дж. Боконбаева, С.Т. Нуржанова, А.А. Какеева // Вестник КРСУ. – 2015 – Т. 15, № 4. – С. 26-28.
14. Быков, В. О. Справочник педиатра / В.О. Быков. – М.: Медицина, 2010. – 120 с.
15. Вакараева, М.М. Действие полиаэзолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, на условно-патогенные микроорганизмы и образование биопленок: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03; 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) / М.М. Вакараева. – Саратов, 2015. – 27 с.
16. Виноградова, И. В. Анализ антибактериальной терапии у новорожденных / И. В. Виноградова // Здоровоохранение Чувашии. – 2011. – № 4. – С. 50–53.
17. ВОЗ. Информационный бюллетень № 331 (ноябрь 2016 г.) // URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/ru/>.
18. Володин, Н.Н. Особенности иммунологической адаптации у новорожденных детей в норме, при респираторном дистресс-синдроме и при пневмонии бактериальной этиологии / Н.Н.Володин, М.В.Дегтярева, Д.Н.Дегтярев, Г.А. Асмолова, К.К. Бахтиян, Л.В. Ковальчук, Л.В. Ганковская, Е.Н. Долгина, Л.В. Никанкина, М.А. Бедианидзе // International Journal on Immunorehabilitation. - 1999. - № 11. - С. 82-89.
19. Володин, Н.Н. Использование молекулярно-генетических технологий, основанных на полимеразной цепной реакции, в диагностике инфекционных заболеваний у новорожденных /Н.Н. Володин, Л.А. Дегтярева, Л.И. Кафарская и др. // Вопр. практ. пед. – 2010. – № 4. – С. 39-46.

20. Врожденная пневмония: клинические рекомендации 15/ Согласованы и утверждены Российским обществом неонатологов на основании результатов коллективного обсуждения проекта клинических рекомендаций // Неонатология: новости, мнения, обучение – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017. - № 4. – С. 133-148.
21. Викторов, В.В. Факторы риска и прогноз развития пневмонии у новорожденных / В.В. Викторов, А.И. Фатыхова, Р.З. Богданова, С.С. Куватов // Медицинский вестник Башкортостана. - 2013.- Т. 8, №3, С. 62-67.
22. Ганковская, Л. В. Система цитокинов амниотической жидкости при внутриутробной инфекции / Л.В. Ганковская, О.В. Макаров, Л.В. Ковальчук и др. // Новые технологии в перинатологии: материалы ежегодного конгресса специалистов перинатальной медицины. – М., 2008. – С. 19.
23. Ганковская, О.А., Ганковская Л.В., Сомова О.Ю., Зверев В.В. Toll-подобные рецепторы, распознающие лиганды вируса герпеса / О.А. Ганковская, Л.В.Ганковская, О.Ю.Сомова, В.В. Зверев // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2009. - № 2. - С. 108-111.
24. Ганковская О. А. Молекулярно-генетические механизмы врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек при патологии инфекционного генеза / автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.03.09. – М., 2010. – 52 с.
25. Геппе, Н. А. Новая рабочая классификация бронхолегочных заболеваний у детей / Геппе Н. А., Розина Н. Н., Волков И. К., Мизерницкий Ю. Л.// Доктор.ру. – 2009. - № 2. – С.7-13
26. Гостев, В. В. Бактериальные биопленки и инфекции / В.В. Гостев, С.В. Сидоренко // Журнал инфектологии. – 2010. – Т. 2. – № 3. – С. 4–15.
27. Глобальная стратегия ВОЗ по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам. WHO / CDS/ CSR / DRS / 2001.2.
28. Голубкова, А.А. Заболеваемость родильниц при вспышке внутрибольничных инфекций новорожденных / А.А.Голубкова, С.С. Смирнова // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2009. - №6. - С. 12-15.

29. Орджоникидзе Н.В. Диагностика внутриутробной инфекции / Н.В. Орджоникидзе, Е.К. Ушницкая // *Акушерство и гинекология*. 2008. - № 5. -С. 12-14.
30. Доброхотский, О.Н. Эпидемиологическое значение биоплёнок в технических системах /О.Н. Доброхотский, Ю.Н. Хомяков, Т.И. Хомякова // *Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие.*– 2008.– № 4.– С. 78–80.
31. Журавлева, Л. Н. Пневмонии у новорожденных: особенности этиологии, клинической картины, диагностики / Л.Н.Журавлева // *Охрана материнства и детства*. – 2016. – №2 (28). – С. 64-68.
32. Железникова, Г.Ф. Вирус и иммунная система хозяина / Г.Ф. Железникова, Ю.В.Лобзин // *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессия*. – 2009. –Т.1, № 3. – С. 10-22.
33. Железникова, Г.Ф. Инфекция и иммунитет: стратегии обеих сторон / Г.Ф. Железникова // *Медицинская иммунология*. - 2006. - Т. 8. - № 5-6. - С.597-614.
34. Зубков, В.В. Диагностическая значимость признаков пневмонии у новорожденных детей / В.В. Зубков, Е.Н. Байбарина, И.И. Рюмина // *Акушерство и гинекология*. – 2012. – №7. – С. 68-73.
35. Зуева, О.С. Этиопатогенез и иммунологические изменения у новорожденных и детей раннего возраста, больных пневмонией / О. С. Зуева // *Вестник ВГМУ*. – 2006. – Т. 5. - № 4. – С. 72–78.
36. Ильина, Т.С. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития / Т.С. Ильина, Ю.М. Романова, А.Л. Гинцбург // *Генетика*. – 2004. – Т. 40. – № 11. – С. 1445–1456.
37. Исследование ассоциации полиморфных маркеров генов TLR2 и TLR9 с преждевременными родами и внутриутробным инфицированием / О.А.Ганковская // *Медицинская иммунология*. - 2010. - Т. 12. - № 1-2. - С. 87-94.
38. Казберюк, Н. А. Медицинская рискология: современное состояние и проблемы / Н.А.Казберюк, О.Е.Коновалов // *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. – 2009. - №3. – 42-47 с.

39. Караулов, А.В. Оценка различных методов иммуномониторинга при проведении иммунокоррекции / А.В. Караулов, В.Ф.Ликов, И.В.Евсегнеева // Аллергология и иммунология. – 2005. – Т.6, № 2. – С. 136.
40. Кельмансон, И. А. Принципы доказательной педиатрии: практ. рук. / И. А. Кельмансон - СПб.: Фолиант, 2004. – 127 с.
41. Киселева, Е. С. Продукты детского питания, способствующие формированию иммунной системы / Е. С. Киселева, А. И. Хавкин // Вестник педиатрической фармакологии и нутрициологии. – 2006. – Т. 3, № 6. – С. 75–77.
42. Клименко, Т. М. Внутриутробные пневмонии у недоношенных новорожденных: ранняя и дифференциальная диагностика / Т. М. Клименко, Л. А. Левченко // Неонатологія, хірургія та перинатальна медицина. – 2011. – Т. 1, № 2. – С.25–30.
43. Клинико-диагностическая характеристика пневмоний у новорожденных при герпетических инфекциях / Н. И. Кудашов, В. В. Зубков, В. Г. Помелова, Л. В. Ванько // Педиатрия. – 2001. – №3. – С. 12–18.
44. Клинико-микробиологические особенности пневмонии у новорожденных / Т. В. Бирюкова, В. А. Гриценко, А. А. Вялкова и др. // Анестезия и реанимация в акушерстве и неонатологии. V Всероссийский образовательный Конгресс – М., 2012. – С. 8–10.
45. Клинические рекомендации. Педиатрия (Пневмония у детей) / Под ред. А. А. Баранова. – М.: ГЕОТАР-Медиа, 2005. – 28 с.
46. Клиническая иммунология и аллергология / Г.Н. Дранник // Одесса: «АстроПринт». – 1999. – 603 с.
47. Коровина, Н. А. Антибактериальная терапия пневмоний у детей: пособие для врачей / Н. А. Коровина, А. Л. Заплатников, И. Н. Захарова. – М.: Медпрактика - М, 2006. – 47 с.
48. Козлов С. Н., Страчунский Л. С. Современная антимикробная химиотерапия: руководство для врачей. — М., 2009. — 448 с.
49. Кривопустов, С. П. Пневмония новорождённых: особенности диагностики и лечения / С. П. Кривопустов // Здоров'я України. – 2008. – № 18/1. – С. 32–33.

50. Критические состояния: качественные уровни системной воспалительной реакции / Е. Ю. Гусев, Л. Н. Юрченко, Н. В. Зотова, Ю. А. Копалова // Интенсивная терапия. – 2006. – Т. 5, № 1. – С. 9–13.
51. Кудашов, Н. И. Клиническая значимость микробиологического мониторинга бактериальных агентов в условиях отделения патологии новорожденных / Н. И. Кудашов // Детские инфекции. – 2009. – № 1. – С. 24–28.
52. Кузнецов И.Н. Научное исследование: методика проведения и оформление / И.Н. Кузнецов // М.: Издательско-торговая корпорация «Дашков и К», 2006. – 460 с.
53. Куличковская, И. В. Внутриутробные инфекции плодов и новорожденных / И. В. Куличковская, В. Ф. Ерёмин // Медицинские новости. – 2007. – № 6. – С. 17–21.
54. Кутбудинова, М. Х. Клинико-иммунологическая характеристика и иммунотерапия пневмонии у новорожденных, инфицированных внутриутробно : автореф. дис. ... д-ра мед. наук : 14.00.09 / М. Х. Кутбудинова. – М., 2004. – 23 с.
55. Лагун, Л.В. Интенсивность образования микробных биопленок микроорганизмами, выделенными при пиелонефритах и мочекаменной болезни / Л.В. Лагун, Д.В. Тапальский, С.В. Жавороник // Медицинский журнал. – 2012. – № 4. – С. 64–67.
56. МакКонки, Э. Геном человека / Э. МакКонки М.: Техносфера, 2008. – 287 с.
57. Маркович, Н.И. Экономический ущерб от ведущих внутрибольничных гнойно-септических инфекций новорожденных и родильниц 93/ Маркович Н.И., Сергеевич В.И., Шарафутдинов Р.Р. и др. //Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2010. - №4. - С. 26-29.
58. Мандрыкина, Ж. А. Генетические факторы при спорадическом самопроизвольном прерывании беременности в I триместре гестации / Ж.А. Мандрыкина, Ю.Э. Доброхотова, Р.И.Озерова [и др.] // Материалы III Ежегодного конгресса специалистов перинатальной медицины и VI съезда РАСПМ «Современная перинатология: организация, технологии и качество». – М., 2008. – С.35.

59. Маянский, А.Н. Стафилококковые биопленки: структура, регуляция, отторжение / А.Н. Маянский, И.В. Чеботарь // Журн. микробиол. – 2011. – № 1. – С. 101–108.
60. Макогон, А. В. Медицина плода – возможности и перспективы нового направления в МЦ «АВИЦЕННА» / А. В. Макогон // Репродуктивная медицина. – 2014. – № 3-4. – С. 44–47.
61. Медико-биологическая статистика: пер. с англ. / С. Гланс. - М: Практика, 1999. – 462 с.
62. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: учебник / В.В. Зверев, М. Н. Бойченко, А. С. Быков [и др.]; под ред. В.В. Зверева. – М.: ГЕОТАР-Медиа, 2016. – 480 с.
63. Механизмы иммунной адаптации у новорожденных детей при внутриутробных пневмониях / С.Н. Бениова, М. С. Полякова, О. В. Невмержицкая [и др.] // Медицинская иммунология. – 2008. – Т. 10, № 4-5. – С. 473-476.
64. Моисеенко, Р. О. Анализ заболеваемости детей первого года жизни в Украине / Р. О. Моисеенко // Перинатология и педиатрия. – 2010. – Т. 41, № 1. – С. 6–9.
65. Морфологические критерии прогнозирования реализации внутриутробной инфекции у новорожденного / О. И. Линева, Т. А. Федорина, Л. В. Прохорова, С. В. Цуркан // Акушерство и гинекология. – 2004. – № 3. – С. 23–26.
66. Назаретян, В. Г. К вопросу о хламидийной инфекции у детей / В. Г. Назаретян, Н. В. Микава, Т. И. Насонова // Вопросы современной педиатрии. – 2006. – № 1. – С. 404.
67. Национальная концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, и информационный материал по ее положениям / В.И.Покровский, В.Г.Акимкин, Н.И.Брико, Е.Б.Брусина, Л.П.Зуева, О.В.Ковалишена, В.Л.Стасенко, А.В.Тутельян, И.В.Фельдблюм, В.В.Шкарин. – Н.Новгород. «Ремедиум Приволжье», - 2012. -84с.

68. Неонатология : нац. рук. / гл. ред. Н. Н. Володин; науч. ред. Е. Н. Байбарина, Г. Н. Буслаева, Д. Н. Дегтярев. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 848 с.
69. Неонатология: национальное руководство / под ред. Акад. РАМН Н. Н. Володина. – М.: ГЭОТАР-Медиа. 2008. – 896 с.
70. Нетребенко, О. К. Питание грудного ребенка и кишечная микрофлора / О. К. Нетребенко // Педиатрия. – 2005. – № 3. – С. 53–58.
71. Неудахин, Е. В. Влияние экологически неблагоприятных факторов на состояние адаптоспособности организма у детей / Е. В. Неудахин, Я. М. Луцкий // Экопатология детского возраста. Сборник лекций и статей. / Под ред. В. Н. Ярыгина, Ю. П. Пивоварова, В. Ф. Демина, С. О. Ключникова. – М., 1995. – С. 44–48.
72. Николаева, И. В. Стрептококковая инфекция группы В у новорожденных и грудных детей / И. В. Николаева // Лечащий врач. – 2012. – № 1. – С. 36–39.
73. Нуржанова, С. Т. Этиологическая структура и особенности клинического течения врожденных и неонатальных пневмоний в Кыргызстане / автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.01.08/ С.Т.Нуржанова. – Бишкек, 2015. – 24с.
74. Оказание стационарной помощи детям. Карманный справочник. Руководство по ведению наиболее распространенных заболеваний в условиях ограниченных ресурсов. Бишкек. - 2012. - С.93.
75. «Острова» патогенности бактерий / Бондаренко В.М. // Микробиология. - 2001. - №4. - С. 67-74.
76. Парахонский, А.П. Иммунный дисбаланс у детей при патологии дыхательной системы бактериальной этиологии / А.П. Парахонский, О.К. Федорович // Успехи современного естествознания. – 2009. – № 4. – С. 48-49.
77. Перинатальные инфекции / под ред. А.Я.Сенчук, З.М. Дубоссарской. – М.: МИА, 2005. – 318 с.
78. Поповцева, О. Н. Диагностическое значение определение цитокинов при вирусных инфекциях / О. Н. Поповцева, С.М.Юдина, Н.И. Стародубова и др. // Цитокины и воспаление. – 2002. – Т. 1, № 3. – С. 125.

79. Пономаренко, Т. Н. Факторы риска острой пневмонии у новорожденных детей / Т. Н. Пономаренко // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2001. – № 10. – С. 47–50.
80. Практическая пульмонология детского возраста: справочник / под ред. В. К. Таточенко. – 3-е изд. – М.: [б. и.], 2006. – 250 с.
81. Пушкарева, Ю. Э. Клинические, микробиологические и иммунологические особенности вентилятор-ассоциированного трахеобронхита у новорожденных с тяжелой дыхательной недостаточностью : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.09 / Ю. Э. Пушкарева. – Екатеринбург, 2010. – 24 с.
82. Покровский, В.И. Внутрибольничные инфекции: новые горизонты профилактики / В.И. Покровский, В.Г. Акимкин, Н.И. Брико и др. // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2011. - №1. - С.4-7.
83. Рабочая классификация основных клинических форм бронхолегочных заболеваний у детей / Н. А. Геппе, Н. Н. Розина, И. К. Волков, Ю. Л. Мизерницкий // Трудный пациент. – 2009. – № 1–2. – С.45–48.
84. Раджабова, З. А. Факторы риска развития перинатальной патологии у беременных с цитомегаловирусной инфекцией / З. А. Раджабова, М. А. Ходжаева // Shoshilinch tibbiyot axborotnomasi – 2009. – № 2. – С. 52–54.
85. Роль Toll-подобных рецепторов и дефенсинов в противомикробной защите урогенитального тракта женщин / Л.В. Ковальчук [и др.] // ЖМЭИ. – 2008. – №1. – С. 46-50
86. Романова, Ю.М. Бактериальная биопленка как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина / Ю.М. Романова, А.Л. Гинцбург // Журн. микробиол. – 2011. – № 3. – С. 99–109.
87. Русанова, Н. Н. Респираторные расстройства у детей с внутриутробными инфекциями / Н. Н. Русанова, О. В. Яворская, Н. А. Соколова // XI национальный конгресс по болезням органов дыхания. – М., 2001. – С. 368.
88. Русанова, Н. Н. Цитомегаловирусная инфекция у детей первых месяцев жизни / Н. Н. Русанова, С. Н. Теплова, С. А. Коченгина. – СПб: Лань, 2001. – 136 с.

89. Рябова, Т. М. Острые пневмонии у детей раннего возраста / Т. М. Рябова // Вестник ВГМУ. – 2003. – Т. 2, № 4. – С. 50–55.
90. Савичева, А. М. Этиологическая диагностика и терапия репродуктивно значимых инфекций / А. М. Савичева // Трудный пациент. – 2007. – Т. 5, № 1. – С. 1–7.
91. Самсыгина, Г. А. Госпитальные пневмонии у детей: этиология и клинко-морфологические особенности / Г. А. Самсыгина, Т. А. Дудина, М. В. Чебышева // Педиатрия. – 2001. – № 1. – С. 5–8.
92. Саркисян, Н.Г. Ассоциация полиморфных маркеров в генах врожденного иммунитета у больных пародонтитом и воспалительными заболеваниями верхних дыхательных путей / Н.Г. Саркисян, Л.В. Ганковская, И.А. Тузанкина, О.А. Свитич, Г.И. Ронь, В.Н. Шершнева, О.Н. Колядина, М.А. Долгих // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. -2016. - № 1. - С. 67-71.
93. Сепсис новорожденных и доказательная медицинская практика - новый подход и повышение качества помощи / Н. Н. Володин, А. Г. Антонов, Е. Н. Байбарина [и др.] // Педиатрия. – 2003. – № 5. – С. 56–60.
94. Сидорова, И. С. Внутриутробная инфекция: диагностика, профилактика и лечение: пособие для врачей женских консультаций / И. С. Сидорова, И. О. Макаров, Н. А. Матвиенко. – М. : МедПресс-информ, 2008. – 32 с.
95. Современное состояние проблемы организации помощи детям с пневмонией в Российской Федерации / Ю. Л. Мизерницкий, Е. В. Сорокина, И. Н. Ермакова [и др.] // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2005. – № 3. – С. 123–131.
96. Состояние фетоплацентарной системы и внутриутробное развитие плода у беременных высокого инфекционного риска / А. А. Авраменко, С. Б. Крюковский, С. С. Томашова, Н. И. Овсянникова // Материалы IX Всероссийского научного форума «Мать и дитя». – М., 2007. – С. 5–6.
97. Сергевнин, В.И. Стандартное эпидемиологическое определение случая и факторы риска внутрибольничной пневмонии доношенных и недоношенных

- детей / В.И. Сергевнин // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2012. - № 2. - С. 4–8.
98. Страчунский, Л. С. Антибактериальная терапия внебольничной пневмонии у детей / Л. С. Страчунский, Л. П. Жаркова // Детский доктор. – 2001. – № 1 (спец. вып.). – С. 14–15.
99. Страчунский, Л. С. Эмпирическая антибактериальная терапия внебольничных пневмоний / Л. С. Страчунский // Терапевтический архив. – 2001. – № 3. – С. 68–73.
100. Супотницкий, М.В. Механизмы развития резистентности к антибиотикам у бактерий / М.В. Супотницкий // Биопрепараты. – 2011. – № 2. – С. 4–44.
101. Таболин, В. А. Актуальные вопросы перинатальной иммунологии / В. А. Таболин, Н. Н. Володин, М. В. Дегтярева // Детская иммунология. – 2007. – № 2. – С. 32–39.
102. Таточенко, В. К. Антибактериальная терапия пневмонии у детей / В. К. Таточенко, Е. В. Середина, А. М. Федоров // Антибиотики и химиотерапия. – 2000. – №5. – С.33-39.
103. Таточенко, В. К. Нозокомиальные инфекции в педиатрическом стационаре / В. К. Таточенко // Вопросы современной педиатрии. – 2003. – Т. 2, № 3. – С. 50–54.
104. Таточенко, В. К. Пневмонии у детей: этиология и лечение / В. К. Таточенко // Лечащий врач – 2002. – № 10. – С. 56–60.
105. Таточенко, В. К. Пневмония у детей: диагностика и лечение / В. К. Таточенко // Лечащий врач. – 2008. – № 8. – С. 63–65.
106. Тец, В.В. Микроорганизмы и антибиотики. Инфекции кожи, мягких тканей, костей и суставов – СПб.: КЛЕ-Т, 2006. – 128 с.
107. Товмасын, А.С. Значение симбиотических взаимодействий биогенного стрептококка при хроническом тонзиллите: автореферат дисс. ... канд. мед. наук / А.С. Товмасын. – М., 2009. – 24 с.
108. Ткаченко, А. К. Пневмонии у новорожденных: учебно-методическое пособие / А.К. Ткаченко// – Мн.: БГМУ, 2004. – 28с.

109. Туркутюков, В.Б. Молекулярно-генетический мониторинг резистентности микроорганизмов к антибиотикам / В.Б. Туркутюков // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2011. – № 2. – С. 28–31.
110. Факторы риска и прогноз развития пневмонии у новорожденных /В.В.Викторов, А.И.Фатыхова, Р.З.Богданова, С.С.Куватов// Медицинский вестник Башкортостана. – 2013. – Т. 8, № 3. – С. 62-67.
111. Флетчер, Р. Клиническая эпидемиология. Основы доказательной медицины / Р.Флетчер, С.Флетчер, Э.Вагнер – М.: 1998. – С.60-74.
112. Цинзерлинг, А. В. Внутриутробные инфекции (частота и диагностика) / А. В. Цинзерлинг, Н. П. Шабалов // Архив патологии. – 1992. – № 1. – С. 24–30.
113. Цинзерлинг, В. А. Перинатальные инфекции. Вопросы патогенеза, морфологической диагностики и клинико-морфологических сопоставлений: практ. рук. / В. А. Цинзерлинг, В. Ф. Мельникова. - СПб: ЭЛБИ-СПб, 2002. – 351 с.
114. Часто и длительно болеющие дети: современные возможности иммунореабилитации: руководство для врачей / Н. А. Коровина, А. Л. Заплатников, А. В. Чебурин [и др.]. – М.: Контимед, 2001. – 68 с.
115. Шабалов, Н. П. Лейкоцитарные индексы клеточной реактивности при двух вариантах сепсиса / Н. П. Шабалов, Д. О. Иванов, Е. А. Курзина // Второй российский конгресс. – М., 2004. – С. 320–321.
116. Шабалов, Н. П. Неонатология : учеб. пособие для студ. мед. вузов: в 2 т. Т. 2 / Н. П. Шабалов. – 4–е изд., испр. и доп. – М.: МЕДпресс-информ, 2006. – 651 с.
117. Шабалов, Н. П. Педиатрия : учебник для мед. вузов / Н. П. Шабалов. – 2–е изд. испр. – СПб: СпецЛит, 2003. – 893 с.
118. Шаропова, О. В. О мерах по улучшению охраны здоровья детей / О. В. Шаропова // Вопросы современной педиатрии. – 2002. – Т. 1, № 2. – С. 13–14.
119. Шаропова, О. В. О мерах по улучшению охраны здоровья детей / О. В. Шаропова // Вопросы современной педиатрии. – 2002. – Т. 1, № 2. – С. 13–14.

120. Шуб, Г.М. Материалы к элективному курсу «Микробные сообщества» / Г.М. Шуб, И.Г. Швиденко, Е.А. Пронина, Н.В. Белобородова // Саратовский научно-медицинский журнал. – Том 6. – 2010. – № 2. – С. 245–247.
121. Эпидемиология резистентности штаммов *S. aureus*, выделенных от пациентов в ОРИТ российских стационаров: результаты многоцентрового исследования / А. В. Дехнич, А. А. Никулин, Е. Л. Рябкова [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2008. – Т. 10, № 4 – С. 333–344.
122. Юнусова, Р.Ю. Разработка хромогенных питательных сред для выделения и ускоренной идентификации условно-патогенных энтеробактерий / автореф. дис. ... канд. мед. наук : 03.02.03/ Р.Ю.Юнусова. – Махачкала, 2011. – 24с.
123. A landscape analysis of recent and ongoing childhood pneumonia etiology studies / Z. Gilani, O. S. Levine, M. Deloria-Knoll [et al.] // Clin Infect Dis. – 2012. Vol. 54, N 2 – P102–108.
124. A preliminary study of pneumonia etiology among hospitalized children in Kenya / L. L. Hammitt, S. Kazungu, S.C. Morpeth // Clin Infect Dis. – 2012. – Vol. 54, Suppl 2. – S190–199.
125. Adegbola, R. A. Childhood pneumonia as a global health priority and the strategic interest of the Bill and Melinda Gates Foundation / R. A. Adegbola // Clin Infect Dis. – 2012. Vol.54, N 2 – P 89–92.
126. Ahmed, A Khattab. Ventilator Associated Pneumonia in A Neonatal Intensive Care Unit / Ahmed A Khattab, Dalia M El-Lahony and Wessam Fathy // J Am Sci 2013. N 9(11) – P 251-258.
127. Barnes, K. Parasite evolution and the immune system / K. Barnes // Allergy Clin. Immunol. Int. J. World Allergy Org. – 2005. – Vol.17. – P.229-236
128. Blencowe, H. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications / Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, Chou D, Moller AB, Narwal R // Lancet (2012) 379(9832):2162–72.

129. Boo, N.Y. Risk factors associated with necrotising enterocolitis in very low birth weight infants in Malaysian neonatal intensive care units / N.Y. Boo, I.G. Cheah // Singapore Med. J. – 2012. – Vol. 53. – №12. – P.826-31.
130. Chen, C.H. Prenatal and postnatal risk factors for infantile pneumonia in a representative birth cohort / C.H. Chen, H.J. Wen, P.C. Chen, // Epidemiol. Infect. – 2012. – Vol. 140. – №7. – P.1277-85.
131. Chest X-ray-confirmed pneumonia in children in Fiji / H. C. Magree, F. M. Russell, R. Sa'aga [et al.] // Bull World Health Organ. – 2005. – Vol. 83, N 6. – P. 427–433.
132. Clinical and immunological studies on neonatal infectious pneumonia / C. H. Chen, C. N. Ye, M. J. Li [et al.] // Zhonghua Er Ke Za Zhi. – 2003. – Vol. 41, N 12. – P. 884–888.
133. Coclite, E. Congenital and perinatal cytomegalovirus lung infection / E. Coclite, C. Di Natale, G. Nigro // J Matern Fetal Neonatal Med. – 2013. – Vol. 26, N 17. – P. 1671-1675.
134. Coclite, E. Congenital and perinatal cytomegalovirus lung infection / E. Coclite, C. Di Natale, G. Nigro // J Matern Fetal Neonatal Med. – 2013. – Vol. 26, N 17. – P. 1671–1675.
135. Common pathogens and clinical characteristics of neonatal pneumonia / H. J. Wang, H. Shi, W. Zhou [et al.] // Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi. – 2012. – Vol. 14, N 12. – P. 898–902.
136. Combs, CA. Amniotic fluid infection, inflammation, and colonization in preterm labor with intact membranes./ Combs CA, Gravett M, Garite TJ, Hickok DE, Lapidus J, Porreco R [et al.] // Am J Obstet Gynecol. – 2014. – Vol 210(2). – P. 121–125.
137. Comparative impact assessment of child pneumonia interventions / L. W. Niessen, A. ten Hove, H. Hilderink [et al.] // Bull World Health Organ. – 2009. – Vol. 87, N 6. – P. 472–480.
138. Comparative randomized trial of azithromycin versus erythromycin and amoxicillin for treatment of community-acquired pneumonia in children / R. Kogan, M. A. Martínez, L. Rubilar [et al.] // Pediatr Pulmonol. – 2003. – Vol. 35, N 2. – P. 91–98.

139. Comparison and evaluation of real-time PCR, real-time nucleic acid sequence-based amplification, conventional PCR, and serology for the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* / K. E. Templeton, S. A. Scheltinga, A. W. Graffelman // *J Clin Microbiol.* – 2003. – Vol. 41, N 9. – P. 4366–4371.
140. Congenital pneumonia with sepsis caused by intrauterine infection of *Ureaplasma parvum* in a term newborn: a first case report / I. Morioka, H. Fujibayashi, E. Enoki [et al.] // *J Perinatol.* – 2010. – Vol. 30, N 5. – P. 359–362.
141. Cytomegalovirus associated neonatal pneumonia and Wilson-Mikity syndrome: a causal relationship / F. Reiterer, H. J. Dornbusch, B. Urlesberger [et al.] // *Eur Respir J.* – 1999. – Vol. 13, N 2. – P. 460–462.
142. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents // *Nat. Rev. Drug Discov.* - 2003. - № 2.- P.114-122/
143. Development of a multiplex real-time quantitative PCR assay to detect *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* and *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory tract secretions / M. Welti, K. Jatton, M. Altwegg [et al.] // *Diagn Microbiol Infect Dis.* – 2003. – Vol. 45, N 2. – P. 85–95.
144. DiGiulio, DB. Prevalence and diversity of microbes in the amniotic fluid, the fetal inflammatory response, and pregnancy outcome in women with preterm pre-labor rupture of membranes. / DiGiulio DB, Romero R, Kusanovic JP, Gomez R, Kim CJ, Seok KS [et al.] // *Am J Reprod Immunol.* – 2010. – Vol. 64(1). – P. 38–57.
145. Dowd, S.E. Survey of bacterial diversity in chronic wounds using Pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing / Dowd, S.E., Sun, Y., Secor, P.R. // *BMC Microbiol.* – 2008. – V. 8. – P. 43.
146. Duke, T. Neonatal pneumonia in developing countries / T. Duke // *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* – 2005. – V.5. – P. 90-94.
147. Elovitz, MA. Intrauterine inflammation, insufficient to induce parturition, still evokes fetal and neonatal brain injury / Elovitz MA, Brown AG, Breen K. [et al.] // *Int J Dev Neurosci.* – 2011. – Vol. 29(6). – P. 663-671.
148. Epidemiology of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp: a nested case-control study from a

- tertiary hospital in London / I. Skippen, M. Shemko, J. Turton [et al.] // *J Hosp Infect.* – 2006. – Vol. 64, N 2. – P. 115–123.
149. Estimates of worldwide distribution of child deaths from acute respiratory infections / B. Williams, E. Gows, C. Boschi-Pinto [et al.] // *Lancet Infect Dis.* – 2002. – Vol. 2, N 1. – P. 25–32.
150. Etiologic agents and outcome determinants of community-acquired pneumonia in urban children: a hospital-based study / A. W. Johnson, K. Osinusi, W. I. Aderele // *J Natl Med Assoc.* – 2008. – Vol. 100, N 4. – P. 370–385.
151. Etiology of acute lower respiratory tract infection / S. K. Kabra, R. Lodha, S. Broor // *Indian J Pediatr.* – 2003. – Vol. 70, N 1. – P. 33–36.
152. Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized children based on WHO clinical guidelines / M. Cevey-Macherel, A. Galetto-Lacour, A. Gervaix [et al.] // *Eur J Pediatr.* – 2009. – Vol. 168, N 12. – P. 1429–1436.
153. Evaluation of real-time PCR for detection and discrimination between *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, and *Bordetella holmesii* for clinical diagnosis / K. E. Templeton, S. A. Scheltinga, A. van der Zee [et al.] // *J Clin Microbiol.* – 2003. – Vol. 41, N 9. – P. 4121–4126.
154. Evaluation of risk factors for the acquisition of bloodstream infections with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species in the intensive care unit; antibiotic management and clinical outcome / R. J. Cordery, C. H. Roberts, S. J. Cooper [et al.] // *J Hosp Infect.* – 2008. – Vol. 68, N 2. – P. 108–115.
155. Fetal tracheolaryngeal airway obstruction: prenatal evaluation by sonography and MRI / J. Courtier, L. Poder, Z. J. Wang [et al.] // *Pediatr Radiol.* – 2010. – Vol. 40, N 11. – P. 1800–1805.
156. Fayon, M. Bacterial flora of the lower respiratory tract in children with bronchial asthma / Fayon M., Just, J., Vu Thien, H., Chiba, T., Pascual, L., Sandouk, G., & Grimfeld, A. // *Acta Paediatr.* – 1999. – Vol. 88. – P. 1216–22.
157. Galinsky, R. The consequences of chorioamnionitis: preterm birth and effects on development / Galinsky R, Polglase GR, Hooper SB, Black MJ, Moss TJ. // *J Pregnancy.* – 2013. – P. 412–831.

158. Gomez, R. The fetal inflammatory response syndrome / Gomez R, Romero R, Ghezzi F, Yoon BH, Mazor M, Berry SM. // *Am J Obstet Gynecol.* – 1998. – Vol. 179(1). – P. 194–202.
159. Hayden, MS. Signaling to NF-kappaB / Hayden MS, Ghosh S. // *Genes Dev* – 2004. – Vol. 18 (18). – P. 2195–224.
160. Hall-Stoodley, L. Evolving concepts in biofilm infections / L. Hall-Stoodley, P. Stoodley // *Cell Microbiol.* – 2009. – V. 11(7) – P. 1034–1043.
161. Inadequate antimicrobial treatment of infections: A risk factor for hospital mortality among critically ill patients/ Kollef M. H., Sherman G., Ward S., [et al.] // *Chest.* - 1999. - Vol. 115. -P. 462-474. Pediatrics; originally published online August 1, 2011; 128:000. URL: [http:// www.antibiotic.ru/index.php?article=2132](http://www.antibiotic.ru/index.php?article=2132).
162. Jurevic, R.J. Single-nucleotide polymorphisms and haplotype analysis in beta-defensin genes in different ethnic populations / Jurevic R.J., Chrisman P., Mancl L. [et al.] // *Genet. Test.* – 2002. - 6(4). – P. 261-9.
163. Kanatiwela D. Biofilms – a friend or foe // *Sciscitator.* – 2014. – V.1. – P. 1-2.
164. Kroner, A. Impact of the Asp299Gly polymorphism in the toll-like receptor 4 (TLR-4) genes on disease course of multiple sclerosis / A. Kroner, F. Vogel, A. Kolb-Mäurer [et al.] // *J. Neuroimmunol.* – 2005. - 165(1-2). – P. 161-5.
165. Mariani-Kurkdjian, P, Extended-spectrum beta-lactamase producing enterobacteriaceae / P. Mariani-Kurkdjian, C. Doit, E. Bingen // *Arch Pediatr.* 2012. – Nov. 19. – Suppl. 3. – P. 93–6.
166. Morita, H. / Morita H., Arae K., Ohno T., Kajiwara N., Oboki K., Matsuda A., Suto H., Okumura K., Sudo K., Takahashi T., Matsumoto K., Nakae S. ST2 Requires Th2-, but Not Th17-, Type Airway Inflammation in Epicutaneously Antigen Sensitized Mice // *Allergy International* - 2012. -Vol. 61, -P. 265-273.
167. McPherson, JA. Genomics of Preterm Birth-Evidence of Association and Evolving Investigations / JA. McPherson, TA. Manuck // *Am J Perinatol.* -2016 Feb; 33(3):222-8. doi: 10.1055/s-0035-1571144.

168. Microbiological etiology in children with community acquired pneumonia / Y. J. Wang, J. Liu, F. Fang [et al.] // *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. – 2010. – Vol. 12, N 3. – P. 184–187.
169. Mitova, Y. Nosocomial infections in neonatological wards in Bulgaria (2000-2009) / Y. Mitova, N. Ribarova, M. Koceva // *Akush Ginekol (Sofia)*. – 2011. – Vol. 50, N 2. – P. 14–19.
170. Mulholland, K. Global burden of acute respiratory infections in children: implications for interventions / K. Mulholland // *Pediatr Pulmonol*. – 2003 – Vol. 36, N 6. – P. 469–474.
171. Multidrug-resistant bacteria in hospitalized children: a 5-year multicenter study / J. Raymond, P. Nordmann, C. Doit [et al.] // *Pediatrics*. – 2007. – Vol. 119, N 4. – P. 798–803.
172. Multiplex Light-Cycler PCR assay for detection and differentiation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in nasopharyngeal specimens / L. M. Sloan, M. K. Hopkins, P. S. Mitchell [et al.] // *J Clin Microbiol*. – 2002. – Vol. 40, N 1. – P. 96–100.
173. Murdoch, D. R. Nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pneumonia / D. R. Murdoch // *Clin Infect Dis*. – 2003. – Vol. 36, N 9. – P. 1162–1170.
174. *Mycoplasma pneumoniae* in children with pneumonia at Mbagathi District Hospital Nairobi / C. C. Bii, H. Yamaguchi, M. Kai [et al.] // *East Afr Med J*. – 2002. – Vol. 79, N 6. – P. 317–322.
175. Nascimento-Carvalho, C. M. Pharmacotherapy of childhood pneumonia / C. M. Nascimento-Carvalho // *Expert Opin Pharmacother*. – 2010. – Vol. 11, N 2. – P. 225–231.
176. Nascimento-Carvalho, C. M. Recommendation of the Brazilian Society of Pediatrics for antibiotic therapy in children and adolescents with community-acquired pneumonia / C. M. Nascimento-Carvalho, H.H. Souza-Marques // *Rev Panam Salud Publica*. – 2004. – Vol. 15, N 6. – P. 380–387.
177. Neonatal mucosal immunization with a non-living, non- genetically modified *Lactococcus lactis* vaccine carrier induces systemic and local Th1-type immunity and

- protects against lethal bacterial infection / K. Ramirez, Y. Ditamo, L. Rodriguez // *Mucosal Immunol.* – 2009. – Vol. 43, N 14. – P. 624–634.
178. Nissen, M. D. Congenital and neonatal pneumonia / M.D. Nissen // *Paediatr Respir Rev.* – 2007. – Vol. 8, N 3. – P. 195–203.
179. Oeckinghaus, A. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation / Oeckinghaus A, Ghosh S. // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2009. – Vol. 194). – P. 000-034.
180. Pneumonia among young infants in rural Southeast Asia (Bohol Island, Philippines) / B. P. Quiambao, P. J. Ruutu, E. A. Ladesma [et al.] // *Trop Med Int Health.* – 2009. Vol. 14 – P 66.
181. Portnoy, D. Manipulation of innate immunity by bacterial pathogens / Portnoy D. // *Curr. Opin. Immunol.* – 2005. – Vol.17. N 1. – P.25-28.
182. Polymorphisms in TLR-2 are associated with congenital cytomegalovirus (CMV) infection but not with congenital CMV disease / Taniguchi R. [et al.] // *Int J Infect Dis.* – 2013. – Vol. 17. – №12. - P. 1092–1097.
183. Predictors of death from severe pneumonia among children 2-59 months old hospitalized in Bohol, Philippines: implications for referral criteria at a first-level health facility / S. P. Lupisan, P. Ruutu, P. E. Abucejo-Ladesma [et al.] // *Trop Med Int Health.* – 2007. – Vol. 12, N 8. – P. 962–971.
184. Prospective surveillance for atypical pathogens in children with community-acquired pneumonia in Japan / M. Bamba, K. Jozaki, N. Sugaya [et al.] // *J Infect Chemother.* – 2006. – Vol. 12, N 1. – P. 36–41.
185. Rinaldi, SF. Anti-inflammatory mediators as physiological and pharmacological regulators of parturition / Rinaldi SF, Hutchinson JL, Rossi AG, Norman JE. // *Expert Rev Clin Immunol.* – 2011. - Vol. 7(5). – P. 675–96.
186. Romero, R. The preterm parturition syndrome / Romero R, Espinoza J, Goncalves LF. [et al.] // *Semin Reprod Med.* – 2007. - Vol. 25(1) P. 21-39.
187. Romero, R. The role of infection in preterm labour and delivery / Romero R, Gómez R, Chaiworapongsa T [et al.] // *The preterm parturition syndrome.* - 2006. - Vol. 15. – P. 41-56.

188. Rodríguez, de Castro F. Genetic variability in susceptibility to and severity of pneumonia / Rodríguez de Castro F, Solé-Violán J, Rodríguez-Gallego JC.// Arch Bronconeumol. -2005 Dec; 41 Suppl 5:21-9
189. Shinkai, H. Biased distribution of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in porcine Toll-like receptor 1 (TLR1), TLR2, TLR4, TLR5 and TLR6 genes / Shinkai H., Tanaka M., Morozumi T., Eguchi-Ogawa T., Okumura N., Muneta Y., Awata T., Uenishi H.. Immunogenetics, -2006, -Vol. 58, -P. 324-330.
190. Singh, V. The burden of pneumonia in children: an Asian perspective / V. Singh // Paediatr Respir Rev. – 2005. – Vol. 6, N 2. – P. 88–93.
191. Snaniotis, C. A. Viral pneumonia in children: incidence and aetiology / C. A. Snaniotis // Pediatr Respi Rev. – 2004. – Vol. 5, Supple A. – S.197–200.
192. Spectrum of pathogens for community-acquired pneumonia in children / X.T. Liu, G.L. Wang, X.F. Luo [et al.] // Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi. – 2013. – Vol. 15, N 1. – P. 42–45.
193. Stein, R. T. Community-acquired pneumonia: a review and recent advances / R.T. Stein, P. J. Marostica // Pediatr Pulmonol. – 2007. – Vol. 42, N 12. – P. 1095–1103.
194. Tanner, J. EpsteinBarr virus induces Fas (CD95) in Tcells and Fas ligand in B-cells leading to Tcell apoptosis / Tanner J., Alfieri C. // Blood. – 1999. –Vol.94. N 10. – P.3439-3447.
195. Technical Basis for the WHO Recommendations on the Management of Pneumonia in Children at First-Level Health Facilities. 1991. Available at: [http://www.who.int/child-adolescent health/New\\_Publications /CHILD\\_HEALTH /WHO.ARI.91.20.pdf](http://www.who.int/child-adolescent-health/New_Publications/CHILD_HEALTH/WHO.ARI.91.20.pdf). Accessed April 30, 2007.
196. The Alabama Preterm Birth Study: umbilical cord blood Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis cultures in very preterm newborn infants / R. L. Goldenberg, W. W. Andrews, A.R. Goepfert [et al.] // Am J Obstet Gynecol. – 2008. – Vol. 198, N 1. – P. 43.e1–5.
197. The Definition of Pneumonia, the Assessment of Severity, and Clinical Standardization in the Pneumonia Etiology Research for Child Health Study / J. Anthony, G. Scott, C. Moisi [et al.] // Clin Infect Dis. – 2012. Vol. 54, N 2. –P109–116.

198. The role of host genetic factors in respiratory tract infectious diseases: systematic review, meta-analyses and field synopsis / Patarčić I, A. Gelemanović, M. Kirin [et al.] // *Sci Rep.* - 2015 Nov 3;5:16119. doi: 10.1038/srep16119.
199. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL10 and regulatory T cells / Netea M., Suttmuller R., Hermann C. [et al.] // *J. Immunol.* - 2004. - Vol.172. - N 6. - P.371-23718.
200. Toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism is associated with an increased risk of pancreatic necrotic infection in acute pancreatitis: a study in the Chinese population / H.K. Gao, Z.G. Zhou, Y. Li [et al.] // *Pancreas.* – 2007. - 34(3). – P. 295-8.
201. Validacion de un metodo para predecir etiologia en ninos con neumonia / M. Karakachoff, C. Battagliotti, J. Maciel, N. Gamba // *Arch Argent Pediatr.* – 2008. – Vol. 106, N 2. – P. 126–131.
202. Vick, EJ. *Gardnerella vaginalis* triggers NLRP3 inflammasome recruitment in THP-1 monocytes / Vick EJ, Park HS, Huff KA, Brooks KM [et al.] // *J Reprod Immunol.* – 2014. – Vol. 106. – P. 67-75.
203. Vieira, R. A. Clinical and laboratory study of newborns with lower respiratory tract infection due to respiratory viruses / R. A. Vieira, E. M. Diniz, F. A. Vaz // *J Matern Fetal Neonatal Med.* – 2003. – Vol. 13, N 5. – P. 341–350.
204. Viral etiology of pneumonia in a cohort of newborns till 24 months of age in Rural Mirzapur, Bangladesh / K. Hasan, P. Jolly, G. Marquis [et al.] // *Scand J Infect Dis.* – 2006. – Vol. 38, N 8. – P. 690–695.
205. Viscardi, R. M. Disordered pulmonary myofibroblast distribution and elastin expression in preterm infants with *Ureaplasma urealyticum* pneumonitis / Viscardi RM, Manimtim W, He JR // *Pediatr Dev Pathol* 2006;9:143-51.
206. Viscardi, R. M. Role of *Ureaplasma* species in neonatal chronic lung disease: epidemiologic and experimental evidence / R. M. Viscardi, J. D. Hasday // *Pediatr Res.* – 2009. – Vol. 65, N 5 (Pt 2). – 84R–90R.

207. Wahlgren, H. Radiological findings in children with acute pneumonia: age more important than infectious agent / Wahlgren H., Mortensson W., Eriksson M., et al. // *Acta Radiol.* - 2005Jul; 46(4):431-6. Sweden.
208. Warnes, SL. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes on abiotic touch surfaces: implications for public health / SL. Warnes, CJ. Highmore, CW. Keevil. // *MBio.* – 2012. – Nov 27. – V. 3 (6).
209. WHO estimates of the causes of death in children / J. Bryce, C. Boschi-Pinto, K. Shibuya [et al.] // *Lancet.* – 2005. – Vol. 365, N 9465. – P. 1114–1116.
210. Wilkins, T. R. Clinical and radiographic evidence of pneumonia / Wilkins T.R., Wilkins R.L. // *Radiol Technol.* 2005 Nov-Dec; 77(2): 106-10. United States.
211. World Health Organization. Consultative meeting to review evidence and research priorities in the management of acute respiratory infections (ARI). Geneva [electronic resource]: WHO; 2003. (WHO/FCH/CAH/04.2). Available from: [http://whqlibdoc.who.int/hq/2004\\_WHO\\_FCH\\_CAH\\_04](http://whqlibdoc.who.int/hq/2004_WHO_FCH_CAH_04). Accessed 30 October 2010. Wucherpennig K.
212. Wolcott, R. The polymicrobial nature of biofilm infection / R. Wolcott [et al.] // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2013. – V. 19(2) – P. 107–112.
213. Yuan, TM. Intrauterine infection inflammation and perinatal brain damage: role of glial cells and Toll-like receptor signaling / Yuan TM, Sun Y, Zhan CY, Yu HM. // *J Neuroimmunol.* – 2010. - Vol. 229. – P. 16–25.
214. Yuan, F.F. Clinical relevance of TLR2, TLR4, CD14 and FcγRIIA gene polymorphisms in *Streptococcus pneumoniae* infection / F.F. Yuan, K. Marks, M. Wong [et al.] // *Immunol Cell Biol.* – 2008. - 86(3). – P. 268-70.
215. Zaoutis, T. E. Risk factors and outcomes of bloodstream infection caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species in children / Zaoutis T. E., Goyal M., Chu J. H., Coffin S. E // *Pediatrics.* 2005; 115(4):942-9.
216. Zafar N., Wallace C. M., Kieffer P. Improving survival of vulnerable infants increases neonatal intensive care unit nosocomial infection rate // *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* — 2001. — Vol. 155. — № 10. — P. 1098—1104.

**ПРИЛОЖЕНИЕ**



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ ДАГЕСТАН  
 ДАГЕСТАНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

СОВЕТ ПО ВНЕДРЕНИЮ НОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ  
 ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ В КЛИНИЧЕСКУЮ ПРАКТИКУ  
 РЕСПУБЛИКИ ДАГЕСТАН

## АКТ

о внедрении  
 (использовании предложения)

№ **10-369**

с. **21 01 200 11**

Автор(ы) или организация разработчик предложения **РКБ,**  
**акушерский и хирургический стационары**

Регистрационный номер патента, свидетельства или рац. предложения \_\_\_\_\_

Название предложения **Способ усовершенствования микро-  
 биологической диагностики нозокомиальных инфек-  
 ций с использованием хромогенных питательных сред**

Предложение внедрено и используется в **РКБ** с. **15 12 200 10**

Ответственный исполнитель (автор) **Алиева А.И.**

Соисполнители (соавторы) **Омарова С.М., Муталипова З.М-К.,  
 Абсерханова Д.У., Касумова А.М., Степанова Н.Д.,  
 Юнусова Р.Ю.**

1-й заместитель Министра  
 Здравоохранения РД

**Ф.А. Габидулаев**

Председатель совета  
 профессор

**А-Г.Д. Алиев**



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ ДАГЕСТАН  
 ДАГЕСТАНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

СОВЕТ ПО ВНЕДРЕНИЮ НОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ  
 ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ В КЛИНИЧЕСКУЮ ПРАКТИКУ  
 РЕСПУБЛИКИ ДАГЕСТАН

## АКТ

о внедрении  
 (использовании предложения)

№ **10-368**

с" **21 01 200 11**

Автор(ы) или организация разработчик предложения  
 "Питательные среды"

**ООО НПП**

Регистрационный номер патента, свидетельства или рац. предложения

Название предложения **Способ усовершенствования микро-биологической диагностики нозокомиальных инфекций с использованием хромогенных питательных сред**

Предложение внедрено и используется в **ПС** с" **15 11 200 10**

Ответственный исполнитель (автор) **Алиева А.И.**

Соисполнители (соавторы) **Омарова С.М., Муталипова З.М-К., Абсерханова Д.У., Касумова А.М., Степанова Н.Д., Юнусова Р.Ю.**

1-й заместитель Министра  
 Здравоохранения РД

*Ф.А. Габидулаев*  
**Ф.А. Габидулаев**

Председатель совета  
 профессор

*А.Г.Д. Алиев*  
**А-Г.Д. Алиев**



**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ ДАГЕСТАН  
ДАГЕСТАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
РЕСПУБЛИКАНСКИЙ СОВЕТ ПО ВНЕДРЕНИЮ НОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ  
ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ В КЛИНИЧЕСКУЮ ПРАКТИКУ**

# АКТ

**о внедрении (использовании)  
предложения**

№ 17-789

с « 17 » 12 2017 г.

Организация, разработчик предложения ООО НПП «Питательные  
среды»

Название предложения Способ прогнозирования неонатальных  
пневмоний

Предложение внедрено и используется в Пит.среды с « 21 » 05 2016

Ответственный исполнитель (автор) Алиева А.И.,

Соисполнители (соавторы) Святич О.А., Омарова С.М.

Первый заместитель Министра  
Здравоохранения РД

Председатель Совета  
профессор



Ф.А. Габидулаев

А-Г.Д. Алиев



**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ ДАГЕСТАН  
ДАГЕСТАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
РЕСПУБЛИКАНСКИЙ СОВЕТ ПО ВНЕДРЕНИЮ НОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ  
ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ В КЛИНИЧЕСКУЮ ПРАКТИКУ**

# АКТ

**о внедрении (использовании)  
предложения**

№ 17-790

с « 17 » 12 2017 г.

Организация, разработчик предложения ООО НПП «Питательные  
среды»

Название предложения Способ диагностики неонатальных пневмоний  
смешанной этиологии

Предложение внедрено и используется в Пит.среды с « 21 » 05 2016

Ответственный исполнитель (автор) Алиева А.И.,

Соисполнители (соавторы) Омарова С.М., Свитич О.А.

**Первый заместитель Министра  
Здравоохранения РД**

**Председатель Совета  
профессор**



*Габидулаев*

**Ф.А. Габидулаев**

*Алиев*

**А-Г.Д. Алиев**



**Международный институт  
прорывных технологий  
и инноваций**



**Международный  
фонд биотехнологий  
имени академика И.Н. Блохиной**

**XI Международный биотехнологический  
форум-выставка  
«РосБиоТех– 2017»**

# ДИПЛОМ

**Награждается**

**Алиева Аминат Исагаевна –**  
к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии  
и иммунологии ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный  
медицинский университет» Минздрава России  
**за разработку**  
**Способ диагностики неонатальных пневмоний**  
**смешанной этиологии**

**Петриченко В.Н.**  
Вице-президент Международного  
биотехнологического фонда  
имени академика И.Н. Блохиной,  
академик РАЕН, д-р с/х наук, профессор,  
эксперт Минсельхоза РФ

**Угодчиков Г.А.**  
Генеральный директор  
Международного фонда биотехнологий  
имени академика И.Н. Блохиной,  
доктор физико-математических наук,  
профессор, академик АМТН РФ

Москва, май 2017