



Еременко Ю.Е.¹, Семижон П.А.², Согоян И.И.¹, Счесленок Е.П.², Шестакова Е.В.¹ ✉,
Дубков Н.А.², Бурдейко Е.Ю.²

¹ Республиканский научно-практический центр оториноларингологии, Минск, Беларусь

² Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Эффективность вторичной медицинской профилактики средних отитов у детей с учетом количественного состава микробиома носоглотки

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: обзор литературы, подбор и анализ данных – Еременко Ю.Е., Семижон П.А., Шестакова Е.В.; концепция и дизайн исследования – Еременко Ю.Е., Семижон П.А., Согоян И.И., Счесленок Е.П., Шестакова Е.В., Дубков Н.А., Бурдейко Е.Ю.

Подана: 21.06.2023

Принята: 08.11.2023

Контакты: tkachenkocat@mail.ru

Резюме

Введение. В последнее время наблюдается рост числа различных форм рецидивирующих отитов у детей. Имеются данные об эффективности использования пробиотиков для профилактики и лечения острых респираторных заболеваний (ОРЗ), однако в отношении отитов у детей исследований недостаточно. Предполагается, что применение пробиотиков будет способствовать уменьшению эпизодов среднего отита и, следовательно, ограничению использования антимикробных лекарственных средств. Известно, что повторяющиеся респираторные инфекции ассоциированы с изменениями микробиома верхних дыхательных путей. Нарушения в микробиоценозах организма человека играют ведущую роль в возникновении патологий инфекционного и неинфекционного характера. Мониторинг видового разнообразия, количественного соотношения различных видов и штаммов микроорганизмов в норме и при различных патологических состояниях необходим для последующей разработки подходов к восстановлению микробиоценоза с помощью микробной терапии – введения в организм отдельных видов микроорганизмов или их консорциумов в зависимости от типа патологии.

Цель. Оценить эффективность вторичной медицинской профилактики средних отитов путем сравнительного анализа количественного состава микробиома носоглотки детей с острым катаральным или экссудативным средним отитом до и после применения пробиотика, содержащего штаммы молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus*, в составе комплексной терапии отитов.

Материалы и методы. Для определения количественного состава микробиома носоглотки детей с острыми катаральными или экссудативными средними отитами до и после вторичной медицинской профилактики проведено проспективное исследование, включающее 25 пациентов. Из них 15 мальчиков (60%) и 10 девочек

(40%). Медиана возраста (среднее значение) по всей когорте – 4 (4,83). Все пациенты получали пробиотик, содержащий 2×10^9 КОЕ *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* в составе комплексной терапии. Пациентам осуществлялось взятие назофарингеальных проб до и после вторичной медицинской профилактики на 14-е и 30-е сутки лечения. Из назофарингеальных проб были выделены микроорганизмы методом количественной ПЦР. Анализ результатов амплификации в режиме реального времени проводили с помощью программного обеспечения используемого прибора для амплификации с оптическим модулем (IQ 5, Bio-Rad). Для проведения количественной оценки исследуемых микроорганизмов применялись стандартные образцы с рассчитанным содержанием количества копий геномных ДНК (ГЭ/мл). Было проанализировано число эпизодов рецидива среднего отита за 1 год до исследования и в течение года после вторичной медицинской профилактики. Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием пакета прикладных программ Statistica 10 (StatSoft, Inc., США, лицензия №AXXR012E839529FA).

Результаты. После вторичной медицинской профилактики средних отитов (применения пробиотиков) у детей наблюдалось статистически значимое увеличение количества комменсальных микроорганизмов рода *Lactobacillus* на 30-е сутки применения пробиотика с 4,85 до 7,2, $p < 0,001$; микроорганизмов рода *Bifidobacterium* – с 1,69 до 7,2, $p < 0,001$; условно-патогенных микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* – с 1,14 до 3,63, $p < 0,001$; микроорганизмов рода *Bacteroides* – с 2,08 до 6,42, $p < 0,001$; микроорганизмов рода *Enterococcus* – с 2,44 до 5,87, $p < 0,001$; микроорганизмов рода *Peptostreptococcus* – с 1,15 до 4,65, $p < 0,001$; микроорганизмов рода *Fusobacterium* – с 3,12 до 7,04, $p < 0,001$.

Заключение. На основе полученных результатов количественного анализа микробиоты носоглотки пациентов с острыми катаральными и экссудативными средними отитами до и после применения вторичной медицинской профилактики выявлены изменения носоглоточного микробиоценоза, выражающиеся в увеличении количественного уровня комменсальных микроорганизмов рода *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* и условно-патогенных микроорганизмов рода *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, семейства *Enterobacteriaceae*. Не выявлено статистически значимого увеличения условно-патогенных микроорганизмов рода *Veillonella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* и *Prevotella*. Установлено, что после проведенного лечения среднее число эпизодов средних отитов снизилось в 2,88 раза: с 5,41 (95% ДИ от 4,82 до 6,00) за 1 год до лечения до 1,88 (95% ДИ от 1,24 до 2,51) в течение 1 года наблюдений после вторичной медицинской профилактики средних отитов, $p < 0,001$. Таким образом, исследование количественного соотношения различных штаммов микроорганизмов носоглотки у пациентов с острым катаральным или экссудативным средним отитом до и после вторичной медицинской профилактики демонстрирует эффективность применения пробиотиков у детей.

Ключевые слова: острые средние отиты у детей, микробиом носоглотки, количественная ПЦР, пробиотики, вторичная медицинская профилактика

Yaromenka Yu.¹, Semijon P.², Sogojan I.¹, Scheslenok E.², Shestakova E.¹ ✉, Dubkov N.², Burdeiko E.²

¹ Republican Scientific and Practical Center of Otorhinolaryngology, Minsk, Belarus

² Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus

Effectiveness of Secondary Medical Prevention of Otitis Media in Children According to the Quantitative Composition of the Nasopharyngeal Microbiome

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: literature review, selection of analytical data and analysis – Yaromenka Yu., Semijon P., Shestakova E.; concept and design of the study – Eremenko Yu., Semijon P., Sogojan I., Scheslenok E., Shestakova E., Dubkov N., Burdeiko E.

Submitted: 21.06.2023

Accepted: 08.11.2023

Contacts: tkachenkocat@mail.ru

Abstract

Introduction. Recently, there has been an increase in the number of various forms of recurrent otitis media in children. There is evidence of the effectiveness of the use of probiotics for the prevention and treatment of acute respiratory diseases, but there is a lack of research regarding recurrent otitis media in children. It is assumed that the use of probiotics will help reduce episodes of otitis media and, therefore, limit the use of antimicrobial drugs. It is known that recurrent respiratory infections are associated with changes in the microbiome of the upper respiratory tract. Violations in the microbiocenosis of the human body play a leading role in the occurrence of pathologies of an infectious and non-infectious nature. Monitoring of species diversity, the quantitative ratio of different species and strains of microorganisms in normal and under various pathological conditions is necessary for the subsequent development of approaches to the restoration of microbiocenosis using microbial therapy – the introduction into the body of certain types of microorganisms or their consortia, depending on the type of pathology.

Purpose. To evaluate the effectiveness of secondary medical prevention of otitis media by a comparative analysis of the quantitative composition of nasopharyngeal microbiome in children with acute catarrhal or exudative otitis media before and after the use of a probiotic containing strains of lactic acid bacteria of the genus *Lactobacillus*, as part of the complex therapy of otitis media.

Materials and methods. To determine the quantitative composition of the microbiome of nasopharynx in children with acute catarrhal or exudative otitis media before and after secondary medical prevention, a prospective study was conducted, including 25 patients. Of these: 15 boys (60%) and 10 girls (40%). The median age (mean) for the entire cohort was 4 (4.83). All patients received a probiotic containing 2×10^9 of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* as part of complex therapy. Patients took nasopharyngeal samples before and after secondary medical prophylaxis on the 14th and 30th days of treatment. Microorganisms were isolated from nasopharyngeal samples by quantitative PCR. Real-time analysis of amplification

results was performed using the software of the used amplification instrument with an optical module (IQ 5, Bio-Rad). To carry out a quantitative assessment of the studied microorganisms, standard samples with a calculated content of the number of copies of genomic DNA (GE/ml) were used. The number of episodes of recurrence of otitis media 1 year before the study and within a year after secondary medical prevention was analyzed. Statistical data processing was carried out using the Statistica 10 software package (StatSoft, Inc., USA, license No. AXXR012E839529FA).

Results. After secondary medical prevention of otitis media (use of probiotics), a statistically significant increase in the number of commensal microorganisms of the genus *Lactobacillus* was observed in children on the 30th day of probiotic use from 4.85 to 7.2, $p < 0.001$; microorganisms of the genus *Bifidobacterium* – from 1.69 to 7.2, $p < 0.001$; conditionally pathogenic microorganisms of the Enterobacteriaceae family – from 1.14 to 3.63, $p < 0.001$; microorganisms of the genus *Bacteroides* – from 2.08 to 6.42, $p < 0.001$; microorganisms of the genus *Enterococcus* – from 2.44 to 5.87, $p < 0.001$; microorganisms of the genus *Peptostreptococcus* – from 1.15 to 4.65, $p < 0.001$; microorganisms of the genus *Fusobacterium* – from 3.12 to 7.04, $p < 0.001$.

Conclusion. Based on the obtained results of a quantitative analysis of the microbiota of the nasopharynx of patients with acute catarrhal or exudative otitis media before and after the use of secondary medical prevention, changes in the nasopharyngeal microbiocenosis were revealed, expressed in an increase in the quantitative level of commensal microorganisms of the genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and conditionally pathogenic microorganisms of the genera *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, family Enterobacteriaceae. There was no statistically significant increase in opportunistic pathogens of the genera *Veillonella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* and *Prevotella*. It was found that after treatment, the average number of episodes of otitis media decreased by 2.88 times: from 5.41 (95% CI from 4.82 to 6.00) 1 year before treatment to 1.88 (95% CI from 1.24 to 2.51) within 1 year of follow-up after secondary medical prevention of otitis media, $p < 0.001$. Thus, the study of the quantitative ratio of different strains of nasopharyngeal microorganisms in patients with acute otitis media before and after secondary medical prevention demonstrates the effectiveness of probiotics in children.

Keywords: acute otitis media in children, nasopharyngeal microbiome, quantitative PCR, probiotics, secondary medical prevention

■ ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время доказано, что формирующаяся в первые годы жизни нормальная симбиотная микрофлора организма является одним из ведущих регуляторных факторов, обеспечивающих адаптацию ребенка к внеутробным условиям жизни, поддержанию гомеостаза, морфофункциональному созреванию иммунной системы и становлению нейроэндокринной регуляции иммунного ответа. В то же время нарушения процесса становления микробиоты у детей раннего возраста неизбежно отражаются на их развитии, состоянии здоровья и резистентности [1–3].

Существует все больше научных данных о положительном влиянии пробиотических средств на состав микробиоты ротовой полости, верхних дыхательных путей

или желудочно-кишечного тракта [4]. Пробиотики представляют собой живые микроорганизмы, приносящие пользу хозяину при введении в адекватных количествах [5]. Бактерии, входящие в состав пробиотических средств, участвуют в ингибировании патогенов, поддержании проницаемости кишечника, модулировании иммунной системы, уменьшении воспаления, облегчении непереносимости лактозы, усилении перистальтики кишечника, снижении концентрации холестерина и другое. Благодаря своим свойствам и клинической ценности пробиотики в настоящее время используются в качестве пищевых добавок и пищевых ингредиентов [4].

В рамках проекта «Микробиом человека» было выявлено более 700 видов бактерий, обитающих в ротовой полости в качестве комменсальных микроорганизмов. Разработаны различные пробиотические смеси для создания большего генетического разнообразия и восстановления нормальной микробиоты [6]. Полезными свойствами обладают многие пробиотики, содержащие микроорганизмы рода *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Bacillus cereus*, *Saccharomyces boulardii* и несколько штаммов кишечной палочки [7]. Однако в большинстве рандомизированных контролируемых испытаний в качестве пробиотиков чаще всего использовались микроорганизмы рода *Lactobacillus* [5].

Актуальным представляется применение пробиотиков при заболеваниях верхних дыхательных путей. Показано, что микробиота, входящая в состав пероральных пробиотиков, может колонизировать не только кишечник, но и носоглотку, поскольку все участки тела человека и связанные с ними микробные ниши взаимосвязаны. Полость носа является частью дыхательных путей человека, через которые организм контактирует с воздухом, загрязняющими веществами, вирусами, микроорганизмами, аллергенами и другими веществами из внешней среды и характеризуется наличием разнообразной микробиоты. Микробиом здоровой полости носа выступает в качестве иммунного барьера против чужеродных инфекционных агентов, при этом происходит пролиферация эпителиальных клеток и увеличение количества патогенных микроорганизмов во время воспалительной реакции. Формируется связь между дисбиозом полости носа и респираторными заболеваниями, такими как аллергический ринит, хронический риносинусит, средний отит и астма [4, 8].

В исследовании Yunli Zhao et al. [5] проведена оценка эффективности и безопасности пробиотиков у людей всех возрастов, подверженных риску острых инфекций верхних дыхательных путей, по данным отдельных рандомизированных контролируемых исследований, в которых приняли участие 6950 человек, включая детей (в возрасте от 1 месяца до 11 лет), взрослых (средний возраст 37,3 года) и пожилых людей (средний возраст 84,6 года). Обнаружено, что пробиотики были лучше, чем плацебо или отсутствие лечения, в профилактике острых инфекций верхних дыхательных путей.

Было показано, что *Lactobacillus rhamnosus* колонизирует миндалины при введении в молочный состав [8].

Ahmed и соавт. [9] установили, что при лечении аллергического ринита дети, принимавшие пробиотик с *Lactobacillus paracasei* в течение 6 недель, имели тот же терапевтический эффект, что и после применения цетиризина. Аналогичным образом исследование, оценивающее использование *Lactobacillus helveticus* для лечения пациентов с аллергическим ринитом легкой и средней степени тяжести в течение 16 недель, показало значительное улучшение состояния пациентов (уменьшение

симптомов аллергического ринита, более низкое количество эозинофилов в риноцитограмме и периферической крови).

Jalali и соавт. [10] обнаружили, что комбинированная терапия с использованием пробиотиков также является важным направлением. В исследовании с применением перорального пробиотика в сочетании с будесонидом показано значительное снижение симптомов аллергии и улучшение качества жизни пациентов по сравнению с применением только будесонида (согласно SNOT-22 и результатам контрольных тестов на аллергический ринит и бронхиальную астму). Также проводились исследования влияния пробиотиков на гуморальный иммунитет при аллергическом рините у человека и животных: большинство сывороточных воспалительных факторов, таких как ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13, IgE, специфический сывороточный IgG1, снизились в разной степени. Наблюдалось повышение секреции некоторых противовоспалительных факторов: ИЛ-10, IFN- γ и специфического сывороточного IgG2a.

В исследовании Antonio Della Volpe et al. [11] показано, что добавление к стандартной терапии среднего отита нутрицевтика, содержащего *Boswellia serrata*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, бромелайн, магний, цинк и мед, позволило уменьшить объем аденоидной ткани, улучшить вентиляцию среднего уха и снизить рецидивы инфекций полости носа и среднего уха. Бромелайн обладает противовирусными и противовоспалительными свойствами. Магний и цинк оказывают противовоспалительное действие. Цинк имеет антиоксидантные свойства, которые помогают снизить концентрацию реагирующих окислительных соединений, которые, в свою очередь, способствуют усилению воспаления и повреждению тканей, а их снижение обуславливает быстрое устранение инфекции и воспаления. Мед и микроорганизмы рода *Lactobacillus* улучшают местный и системный иммунный ответ. Это исследование подтвердило эффективность нутрицевтиков в качестве поддерживающей терапии для лечения как инфекций верхних дыхательных путей, так и острого среднего и/или экссудативного отита у детей.

В исследовании Cardenas et al. [12] применяли пробиотик, содержащий *Lactobacillus salivarius* и обладающий сильным антагонизмом по отношению к отопатогенам. Количество эпизодов среднего отита у пациентов, принимавших *Lactobacillus salivarius*, значительно уменьшилось (84%) по сравнению с теми, которые получали стандартную терапию в течение шестимесячного периода до применения пробиотика.

В исследовании Lorenzo Drago et al. [6] показано, что применение пробиотиков, содержащих *Lactobacillus salivarius* и *Bifidobacterium breve*, приводит к более выраженному иммуномодулирующему действию на мононуклеарные клетки периферической крови пациентов с астмой, значительно снижает, более чем на треть, частоту рецидивов.

Tingfeng Du et al. [7] выявили положительное влияние пробиотиков на исход и продолжительность заболевания при проведении клинических испытаний эффективности применения пробиотиков, содержащих микроорганизмы рода *Lactobacillus*, у здоровых людей и пациентов с инфекцией верхних дыхательных путей. Установлено, что клиническое применение пробиотиков, содержащих бактерии рода *Lactobacillus*, является перспективным для снижения риска частоты, тяжести и длительности инфекций дыхательных путей.

Nivia Cárdenas et al. [10] исследовали эффективность применения пробиотика, содержащего *L. salivarius* PS7B, у детей с рецидивирующим острым средним отитом. В течение 6-месячного периода дети, включенные в исследование, ежедневно потребляли $\sim 1 \times 10^9$ КОЕ *L. salivarius* PS7. Комплаентность во время исследования была очень высокой ($\geq 96\%$). 36% детей с рецидивирующим острым средним отитом, принимавших пробиотик, перенесли 1 эпизод острого среднего отита со средней продолжительностью 4 дня. 70% детей с рецидивирующим острым средним отитом, которые не получали пробиотик, перенесли 1 эпизод острого среднего отита со средней продолжительностью 6 дней. Количество эпизодов острого среднего отита в течение 6-месячного периода исследования уменьшилось на 84% у детей, принимавших пробиотик. Хотя любой ребенок с острым средним отитом проходил антибиотикотерапию, количество назначаемых антимикробных лекарственных средств уменьшилось примерно на 60% у детей, получавших пробиотический штамм, по сравнению с другими детьми с рецидивирующим острым средним отитом, которые не получали пробиотик.

В исследовании Sarah King et al. [13] доказано, что дети, получавшие пробиотики, содержащие бактерии родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, для снижения риска острых инфекций дыхательных путей и острых инфекций нижних отделов пищеварительного тракта, имеют статистически значимо более низкий относительный риск назначения антибиотиков (относительный риск 0,71; 95% ДИ: 0,54–0,94).

В исследовании Anna M Scott et al. [14] произведен поиск и анализ данных о влиянии пробиотиков на профилактику возникновения и снижение тяжести острого среднего отита у детей. Было включено 17 рандомизированных контролируемых исследований с участием 3488 детей. Обнаружено, что среди детей, принимавших пробиотики во время лечения, число эпизодов острого среднего отита было ниже по сравнению с группой детей, которые не принимали пробиотические добавки. Также применение пробиотиков способствовало уменьшению доли детей, принимающих антибиотики при любых инфекциях. Однако недостаточно статистически значимых данных о влиянии пробиотиков на тяжесть острого среднего отита и продолжительность эпизодов заболевания, потребность в применении антибактериальных лекарственных средств. Среди детей, предрасположенных к отиту, не было различий между опытной группой, получавшей пробиотики, и группами сравнения.

Таким образом, существуют доказательства использования пробиотиков при некоторых воспалительных заболеваниях полости рта, носоглотки и среднего уха. Пробиотические эффекты могут варьироваться в зависимости от штамма и продолжительности курса лечения.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить эффективность вторичной медицинской профилактики средних отитов путем сравнительного анализа количественного состава микробиома носоглотки детей с острым катаральным или экссудативным средним отитом до и после применения пробиотика, содержащего штаммы молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus*, в составе комплексной терапии.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для определения количественного состава микробиома носоглотки детей с острым катаральным или экссудативным средним отитом до и после вторичной медицинской профилактики проведено проспективное исследование, включающее 25 пациентов. Из них: 15 мальчиков (60%) и 10 девочек (40%). Медиана возраста (среднее значение) по всей когорте – 4 (4,83).

Все пациенты получали пробиотик, содержащий 2×10^9 КОЕ *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, в составе комплексной терапии.

Включение пациентов в исследование осуществлялось по ранее разработанным критериям.

Критерии включения пациентов в исследование:

- наличие 3 или более отдельных эпизодов острого катарального среднего отита за период 6 месяцев или 4 и более эпизодов за период 12 месяцев;
- наличие 2–3 эпизодов экссудативного среднего отита за последний календарный год или 2 и более месяца затяжного эпизода отита;
- возраст пациентов 3–11 лет.

Критерии исключения пациентов из исследования:

- прием антибактериальных (местного и системного действия) лекарственных средств и пробиотиков в течение месяца до взятия биологических материалов (мазков из носоглотки и фекалий);
- достижение пациентом 12-летнего возраста во время исследования;
- отказ родителей/опекунов пациента от дальнейшего исследования (устный или письменный);
- сопутствующая тяжелая патология эндокринной системы;
- сопутствующая тяжелая патология со стороны пищеварительной системы;
- сопутствующая тяжелая патология со стороны нервной системы;
- сопутствующая тяжелая патология со стороны иммунной системы;
- сопутствующая тяжелая патология со стороны опорно-двигательного аппарата;
- сопутствующая тяжелая патология со стороны органов дыхания;
- сопутствующая тяжелая патология со стороны мочевыделительной системы;
- наличие онкологического заболевания;
- наличие тяжелых нарушений кровообращения и крови.

Всем пациентам осуществлялось взятие назофарингеальных проб до и после вторичной медицинской профилактики на 14-е и 30-е сутки лечения.

Взятие материала выполнялось по ранее разработанной нами методике после информирования родителей/опекунов ребенка о проведении исследования со взятием информированного согласия в устной и письменной форме [15].

Из бактериальной фракции назофарингеальных проб с использованием коммерческих наборов «НКЭкстра» и комплекта реагентов «НуклеСорб» (Республика Беларусь) для одновременного выделения ДНК и РНК из образцов биологического материала методом преципитации выделялся пул ДНК/РНК.

Для постановки ПЦР с целью получения специфических фрагментов генома бактерий и количественной ПЦР проводили реакцию с использованием 11 ПЦР-смесей, включающих олигонуклеотиды и гибридационно-флуоресцентные пробы, позволяющие идентифицировать генетический материал микроорганизмов. Реакцию

проводили с использованием фермента SmArtTaq-polimerase («АртБиоТех», Беларусь).

Анализ результатов амплификации в режиме реального времени проводили с помощью программного обеспечения используемого прибора для амплификации с оптическим модулем (IQ 5, Bio-Rad). Электрофоретическую детекцию продуктов амплификации осуществляли в 2% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием и визуализацией фрагментов ДНК в УФ-свете. Для проведения количественной оценки исследуемых микроорганизмов использовались стандартные образцы с рассчитанным содержанием количества копий геномных ДНК (ГЭ/мл).

Было проанализировано число эпизодов рецидива среднего отита за 1 год до исследования и в течение года после вторичной медицинской профилактики (применения пробиотиков).

Статистический анализ полученных данных проводился согласно общепринятым требованиям к медико-биологическим исследованиям. Использовались непараметрические методы статистики. В описательной статистике данных для показателей, не имеющих нормального распределения, представлены нижний и верхний квартили, минимум и максимум, средняя величина, стандартная ошибка среднего, уровень статистической значимости, а также 95% доверительный интервал среднего (количество микроорганизмов оценивалось по логарифмической шкале как $\log$ (копий ГЭ/мл)). Критическое значение уровня значимости принималось равным 5%. Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием пакета прикладных программ Statistica 10 (StatSoft, Inc., США, лицензия №АХХR012Е839529FA).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате анализа назофарингеальных проб, содержащих ДНК микроорганизмов носоглотки детей с острыми катаральными или экссудативными средними отитами, методом количественной ПЦР в режиме реального времени до и после применения метода вторичной медицинской профилактики средних отитов были получены данные динамики изменения количества микроорганизмов (табл. 1).

Исследование динамики содержания микроорганизмов в назофарингеальных пробах в период лечения показало, что по некоторым видам произошло статистически значимое увеличение их количества уже на 14-е сутки.

Установлено:

- значимое увеличение количества условно-патогенных микроорганизмов рода *Bacteroides* на 14-е сутки лечения пробиотиком с 2,08 до 6,43, $p < 0,001$;
- значимое увеличение количества условно-патогенных микроорганизмов рода *Enterococcus* на 14-е сутки лечения пробиотиком с 2,44 до 5,88, $p < 0,001$;
- значимое увеличение количества комменсальных микроорганизмов рода *Lactobacillus* на 14-е сутки лечения пробиотиком с 4,85 до 7,59, $p < 0,001$;
- значимое увеличение количества условно-патогенных микроорганизмов рода *Peptostreptococcus* на 14-е сутки лечения пробиотиком с 1,15 до 4,4, $p < 0,001$;
- значимое увеличение количества условно-патогенных микроорганизмов рода *Fusobacterium* на 14-е сутки лечения пробиотиком с 3,12 до 7,63, $p < 0,001$.

Таблица 1

Данные средних значений количественной ПЦР микроорганизмов носоглотки пациентов до и после вторичной медицинской профилактики
Table 1

The results of the mean values of quantitative PCR microorganisms of patient's nasopharynx before and after secondary medical prevention

Род микро- организма	До лечения				На 14-е сутки лечения					На 30-е сутки лечения				
	Mean*	95% ДИ*	SE*		Mean	95% ДИ	SE	p		Mean	95% ДИ	SE	p	
Staphylococcus	4,09	3,06	5,13	0,50	4,55	4,74	5,35	0,15	0,672	4,12	4,77	5,37	0,15	0,617
Enterobacteriaceae	1,14	0,25	2,02	0,43	2,66	1,54	3,78	0,54	0,074	3,63	2,54	4,73	0,53	<0,001
Bacteroides	2,08	1,27	2,89	0,39	6,43	5,98	6,88	0,22	<0,001	6,42	5,96	6,88	0,22	<0,001
Enterococcus	2,44	1,25	3,63	0,58	5,88	5,47	6,3	0,2	<0,001	5,87	5,46	6,28	0,2	<0,001
Lactobacillus	4,85	3,60	6,09	0,60	7,59	6,56	7,82	0,31	<0,001	7,2	6,89	7,51	0,15	<0,001
Streptococcus	1,06	0,03	2,09	0,50	1,34	0,66	2,35	0,49	0,375	1,02	0,34	2,02	0,58	0,269
Peptostreptococcus	1,15	0,01	2,29	0,55	4,4	3,37	5,43	0,5	<0,001	4,65	3,49	5,81	0,56	<0,001
Prevotella	1,95	0,99	2,92	0,47	2,56	1,84	3,27	0,35	0,476	2,94	2,01	3,88	0,45	0,169
Bifidobacterium	1,69	0,75	2,63	0,46	2,66	1,76	3,56	0,44	0,059	3,15	2,08	4,22	0,52	0,043
Fusobacterium	3,12	1,63	4,61	0,72	7,63	6,62	7,83	0,29	<0,001	7,04	6,73	7,36	0,15	<0,001
Veillonella	1,38	0,29	2,47	0,53	1,68	0,72	2,55	0,54	0,574	1,15	0,23	2,25	0,57	0,527

Примечания: * Mean – среднее количество микроорганизмов в лог копий ГЭ/мл; 95% доверительный интервал среднего, SE – стандартная ошибка среднего, p – уровень статистической значимости различий.

Не наблюдалось статистически значимого увеличения количества следующих микроорганизмов на 14-е сутки лечения:

- количество условно-патогенных микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae на 14-е сутки лечения пробиотиком увеличилось с 1,14 до 2,66, $p=0,074$;
- количество условно-патогенных микроорганизмов рода Prevotella на 14-е сутки лечения пробиотиком увеличилось с 1,95 до 2,56, $p=0,476$;
- количество комменсальных микроорганизмов рода Bifidobacterium на 14-е сутки лечения пробиотиком увеличилось с 1,69 до 2,66, $p=0,059$;
- количество условно-патогенных микроорганизмов рода Veillonella на 14-е сутки лечения пробиотиком варьировало с 1,38 до 1,68, $p=0,574$;
- количества условно-патогенных микроорганизмов рода Streptococcus на 14-е сутки лечения пробиотиком варьировало с 1,06 до 1,34, $p=0,375$;
- количество условно-патогенных микроорганизмов рода Staphylococcus на 14-е сутки лечения пробиотиком варьировало с 4,09 до 4,55, $p=0,672$.

На 30-е сутки лечения происходило дальнейшее статистически значимое увеличение количества микроорганизмов. Наблюдалось:

- статистически значимое увеличение количества условно-патогенных микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae на 30-е сутки лечения пробиотиком с 1,14 до 3,63, $p<0,001$;
- статистически значимое увеличение количества условно-патогенных микроорганизмов рода Bacteroides на 30-е сутки лечения пробиотиком с 2,08 до 6,42, $p<0,001$;

Таблица 2

Среднее число эпизодов отитов до и после вторичной медицинской профилактики

Table 2

Mean number of episodes of otitis media before and after secondary medical prevention

Показатель	Mean	95% ДИ		Min	Max	LQ	UQ	p
Отиты до лечения	5,41	4,82	6,00	3,00	12,0	4,00	6,00	<0,001
Отиты после лечения	1,88	1,24	2,51	0,00	10,0	0,00	2,00	

- статистически значимое увеличение количества условно-патогенных микроорганизмов рода *Enterococcus* на 30-е сутки лечения пробиотиком с 2,44 до 5,87, $p<0,001$;
- статистически значимое увеличение количества комменсальных микроорганизмов рода *Lactobacillus* на 30-е сутки лечения пробиотиком с 4,85 до 7,2, $p<0,001$;
- статистически значимое увеличение количества условно-патогенных микроорганизмов рода *Peptostreptococcus* на 30-е сутки лечения пробиотиком с 1,15 до 4,65, $p<0,001$;
- статистически значимое увеличение количества условно-патогенных микроорганизмов рода *Fusobacterium* на 30-е сутки лечения пробиотиком с 3,12 до 7,04, $p<0,001$;
- статистически значимое увеличение количества комменсальных микроорганизмов рода *Bifidobacterium* на 30-е сутки лечения пробиотиком с 1,69 до 3,15, $p<0,043$.

Не наблюдалось статистически значимого увеличения количества следующих микроорганизмов:

- род *Staphylococcus*: на 30-е сутки лечения пробиотиком количество микроорганизмов варьировало с 4,09 до 4,12, $p=0,617$;
- род *Prevotella*: на 30-е сутки лечения пробиотиком количество микроорганизмов увеличилось с 1,95 до 2,94, $p=0,169$;
- количество условно-патогенных микроорганизмов рода *Streptococcus* на 30-е сутки лечения пробиотиком варьировало с 1,06 до 1,02, $p=0,269$;
- количество условно-патогенных микроорганизмов рода *Veillonella* на 30-е сутки лечения пробиотиком варьировало с 1,38 до 1,15, $p=0,527$.

Пациенты, включенные в исследование, наблюдались в течение 1 года до и после вторичной медицинской профилактики, выполнялся анализ количества эпизодов средних отитов.

В табл. 2 представлены среднее число эпизодов отитов за 1 год до лечения и в течение 1 года после лечения, нижний (LQ) и верхний квартили (UQ), минимум и максимум, а также 95% доверительный интервал среднего числа эпизодов отитов до и после вторичной медицинской профилактики средних отитов.

Установлено, что после проведенного лечения среднее число эпизодов острых катаральных или экссудативных средних отитов снизилось в 2,88 раза: с 5,41 эпизода (95% ДИ от 4,82 до 6,00) до 1,88 раза за 1 год (95% ДИ от 1,24 до 2,51), $p<0,001$.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе полученных результатов количественного анализа микробиома носоглотки пациентов с острыми катаральными или экссудативными средними отитами

до и после применения пробиотика, содержащего штаммы молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus*, в составе комплексной терапии установлено:

1. Статистически значимое увеличение количества комменсальных микроорганизмов рода *Lactobacillus* на 30-е сутки применения пробиотика с 4,85 до 7,2, $p < 0,001$.
2. Статистически значимое увеличение количества комменсальных микроорганизмов рода *Bifidobacterium* на 30-е сутки применения пробиотика с 1,69 до 3,15, $p < 0,043$.
3. Статистически значимое увеличение количества условно-патогенных микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* на 30-е сутки применения пробиотика с 1,14 до 3,63, $p < 0,001$.
4. Статистически значимое увеличение количества условно-патогенных микроорганизмов рода *Bacteroides* на 30-е сутки применения пробиотика с 2,08 до 6,42, $p < 0,001$.
5. Статистически значимое увеличение количества условно-патогенных микроорганизмов рода *Enterococcus* на 30-е сутки применения пробиотика с 2,44 до 5,87, $p < 0,001$.
6. Статистически значимое увеличение количества условно-патогенных микроорганизмов рода *Peptostreptococcus* на 30-е сутки применения пробиотика с 1,15 до 4,65, $p < 0,001$.
7. Статистически значимое увеличение количества условно-патогенных микроорганизмов рода *Fusobacterium* на 30-е сутки применения пробиотика с 3,12 до 7,04, $p < 0,001$.
8. Не наблюдалось статистически значимого увеличения количества условно-патогенных микроорганизмов рода *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Veillonella* и *Prevotella* на 30-е сутки применения пробиотика, $p > 0,05$.
9. Снижение среднего числа эпизодов отитов в 2,88 раза: с 5,41 (95% ДИ от 4,82 до 6,00) за 1 год до лечения до 1,88 (95% ДИ от 1,24 до 2,51) в течение 1 года после вторичной медицинской профилактики средних отитов, $p < 0,001$.

Таким образом, изменения состава микробиома носоглотки у детей с острыми катаральными или экссудативными средними отитами после вторичной медицинской профилактики средних отитов характеризовались увеличением количественного уровня комменсальных микроорганизмов рода *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* и условно-патогенных микроорганизмов рода *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, семейства *Enterobacteriaceae*.

Полученные данные имеют важное практическое значение и доказывают эффективность применения пробиотиков в составе комплексной терапии у пациентов с острыми катаральными или экссудативными средними отитами в стационарных и амбулаторных условиях.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Francesco Folino, Luca Ruggiero, Pasquale Capaccio, et al. Upper Respiratory Tract Microbiome and Otitis Media Intertalk: Lessons from the Literature. *J Clin Med*. 2020 Sep 2;9(9):2845. doi: 10.3390/jcm9092845
2. Francesco Di Pierro, Paolo Rizzo, Elena Poggi, et al. Use of *Streptococcus salivarius* K12 to reduce the incidence of pharyngo-tonsillitis and acute otitis media in children: a retrospective analysis in notrecurrent pediatric subjects. *Minerva Pediatr*. 2018 Jun;70(3):240–245. doi: 10.23736/S0026-4946.18.05182-4

3. Zaplatnikov A.L., Girina A.A., Lepiseva I.V., et al. On the issue of rational treatment of acute respiratory infections in children under conditions of growing antibiotic resistance *Pediatrics. Consilium Medicum*. 2018;(4):37–41. (in Russian)
4. Guangqiang Wang, Yunhui Chen, Yongjun Xia, et al. Characteristics of Probiotic Preparations and Their Applications. *Foods*. 2022;11(16):2472. doi: 10.3390/foods11162472
5. Zhao Y, Dong BR, Hao Q. Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2022; Issue 8 (Art. No.: CD006895). doi: 10.1002/14651858.CD006895.pub4
6. Lorenzo Drago, Luigi Cioffi, Maria Giuliano, et al. The Probiotics in Pediatric Asthma Management (PROPAM) Study in the Primary Care Setting: A Randomized, Controlled, Double-Blind Trial with *Ligilactobacillus salivarius* LS01 (DSM 22775) and *Bifidobacterium breve* B632 (DSM 24706). *J Immunol Res*. 2022 Jan 17;2022:3837418. doi: 10.1155/2022/3837418
7. Tingfeng Du, Aihua Lei, Naiyu Zhang, et al. The Beneficial Role of Probiotic *Lactobacillus* in Respiratory Diseases. *Front Immunol*. 2022 May 31;13:908010. doi: 10.3389/fimmu.2022.908010
8. Marianne F. L. van den Broek, Ilke De Boeck, Filip Kiekens et al. Translating Recent Microbiome Insights in Otitis Media into Probiotic Strategies. *ASM Journals Clinical Microbiology Reviews*. 2019;32(4). doi: 10.1128/CMR.00010-18
9. Ahmed M, Billoo AG, Iqbal K. Efficacy of probiotic in perennial allergic rhinitis under five year children: a randomized controlled trial. *Pak J Med Sci*. 2019;35(6):1538–1543. doi: 10.12669/pjms.35.6.744
10. Jalali MM, Soleimani R, Alavi Foumani A, et al. Add-on probiotics in patients with persistent allergic rhinitis: a randomized crossover clinical trial. *Laryngoscope*. 2019;129(8):1744–1750. doi: 10.1002/lary.27858
11. Antonio Della Volpe, Pietro De Luca, Antonietta De Lucia, et al. Single-Center-Single-Blinded Clinical Trial to Evaluate the Efficacy of a Nutraceutical Containing *Boswellia Serrata*, Bromelain, Zinc, Magnesium, Honey, Tyndallized *Lactobacillus Acidophilus* and Casei to Fight Upper Respiratory Tract Infection and Otitis Media. *Healthcare (Basel)*. 2022 Aug 13;10(8):1526. doi: 10.3390/healthcare10081526
12. Nivia Cardenas, Virginia Martin, Rebeca Arroyo, et al. Prevention of Recurrent Acute Otitis Media in Children Through the Use of *Lactobacillus salivarius* PS7, a Target-Specific Probiotic Strain. *Clinical Trial. Nutrients*. 2019 Feb 12;11(2):376. doi: 10.3390/nu11020376
13. Sarah King, Daniel Tancredi, Irene Lenoir-Wijnkoop Does probiotic consumption reduce antibiotic utilization for common acute infections? A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Public Health*. 2019 June;29 (Issue 3):494–499. doi: 10.1093/eurpub/cky185
14. Anna M Scott, Justin Clark, Blair Julien, et al. Probiotics for preventing acute otitis media in children. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2019. doi: 10.1002/14651858.CD012941.pub2
15. Yaromenka Yu., Semijon P., Sogojan I., et al. Microbial spectrum of the nasopharynx in children with exudative otitis media. *Otorhinolaryngology. Eastern Europe*. 2022;12(4):404–413. (in Russian)