

Matija Kiker^{1**}, Julija Klančič^{2**}, Mihael Rus³, Štefan Grosek⁴

Povezava med prevladujočo aerobno rastočo črevesno floro pri izjemno nedonošenih novorojenčkih, rojenih z 28 tedni gestacije ali manj, in težjimi zapleti nedonošenosti*

The Association Between Dominant Aerobic Gut Flora in Extremely Preterm Infants Born at 28 Weeks of Gestation or Less and Severe Complications of Prematurity

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: novorojenček, vaginalna flora, kožna flora, črevesna disbioza, črevesna flora, okužba, zapleti nedonošenosti

IZHODIŠČA. Izjemno nedonošeni novorojenčki (< 28 tednov gestacije) imajo visoko tveganje za nastanek resnih zapletov in boleznih nedonošenosti. Za napovedovanje težjih okužb, boleznih in zapletov nedonošenosti je bila pogosto uporabljena tudi mikrobiološka analiza črevesne flore v blatu, kljub temu da je v strokovni literaturi malo dokazov, ki bi podpirali njeno diagnostično uporabnost. Namen raziskave je bil analizirati morebitno povezavo med prevladujočo aerobno črevesno floro in težjimi zapleti, okužbami in boleznimi nedonošenosti ter na podlagi tega potrditi oz. ovreči diagnostično uporabnost jemanja blata za mikrobiološko analizo pri izjemno nedonošenih novorojenčkih. Prav tako smo v raziskavi iskali povezave med črevesno floro in ostalimi florami na telesu novorojenčka. **METODE.** Izvedli smo retrospektivno raziskavo, v katero smo vključili 55 otrok, rojenih med letoma 2017 in 2022, z gestacijsko starostjo manj kot 28 tednov, ki jim je bilo v prvih 30 dneh po rojstvu odvzeto blato. Statistične teste smo izvajali pri stopnji tveganja 5 % ($\alpha = 0,05$). **REZULTATI.** Povezave med prevladujočo aerobno črevesno floro in težjimi okužbami, boleznimi ter zapleti nedonošenosti v raziskavi nismo našli, prav tako ne med prevladujočo črevesno floro in ostalo floro na telesu novorojenčka, razen v dveh primerih. **RAZPRAVA.** Glede na rezultate raziskave lahko zaključimo, da mikrobiološko testiranje blata pri izjemno nedonošenih novorojenčkih, ki se uporablja za napovedovanje težjih okužb, boleznih in zapletov nedonošenosti, nima diagnostične vrednosti.

** Avtorja si delita mesto prvega avtorstva

¹ Matija Kiker, štud. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana; matija.kiker@medrazgl.si

² Julija Klančič, štud. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

³ Mihael Rus, dr. med., Enota za intenzivno nego in terapijo novorojenčkov, Klinični oddelek za perinatologijo, Ginekološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Šljajmerjeva ulica 4, 1000 Ljubljana

⁴ Prof. dr. Štefan Grosek, dr. med., višji svetnik, Enota za intenzivno nego in terapijo novorojenčkov, Klinični oddelek za perinatologijo, Ginekološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Šljajmerjeva ulica 4, 1000 Ljubljana; Katedra za pediatrijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Bohoričeva ulica 20, 1000 Ljubljana; Katedra za medicinsko etiko, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

* Objavljeno delo je bilo nagrajeno s fakultetnim Prešernovim priznanjem v letu 2024.

ABSTRACT

KEY WORDS: newborn, vaginal flora, skin flora, intestinal dysbiosis, gut flora, infection, complications of prematurity

BACKGROUND. Extremely preterm newborns (< 28 weeks gestation) are at high risk for serious diseases and severe complications of prematurity. Microbiological testing of the intestinal flora from the infants' stool was commonly used by clinicians to predict severe infections, diseases, and complications of prematurity, despite limited evidence on its diagnostic utility. This research aimed to confirm or refute the diagnostic utility of intestinal flora sampling in extremely preterm newborns, in addition, the research aimed to analyse potential associations between predominant aerobic intestinal flora patterns and other body microbiotas in relation to severe infections, diseases, or complications of prematurity. **METHODS.** A retrospective study was conducted, which included 55 children born between 2017 and 2022, with a gestational age of less than 28 weeks, who had stool samples taken within the first 30 days after birth. Statistical tests were performed using a maximum permissible type I error rate of 5% ($\alpha = 0.05$). **RESULTS.** The research indicated that there is no association between predominant aerobic intestinal flora and severe infections, diseases, or complications of prematurity, nor between predominant aerobic intestinal flora and other body microbiotas except in two cases. **DISCUSSION.** Based on the results, intestinal flora (stool) sampling for microbiological testing is not sensible for the detection of severe infections, diseases, or complications of prematurity, and is hence neither diagnostically useful nor reliable for confirming infections and predicting diseases and severe prematurity complications in extremely preterm newborns.

IZHODIŠČA

Nastanek in razvoj normalne neonatalne flore

Človeško floro oz. mikrobioto sestavljajo vsi mikroorganizmi, ki živijo na in v človeškem telesu. Razvija se od rojstva (oz. že od oploditve) do smrti in se pri tem nenehno spreminja, vendar vedno ostaja v homeostatskem ravnovesju z imunskim sistemom človeka. Vpliva tudi na presnovo in prehranjenost (1, 2). Na človeškem telesu poznamo več različnih flor (npr. kožna, črevesna, nožnična, očesna, ustna itd.). Največjo izmed vseh predstavlja gastro-intestinalna oz. črevesna flora, ki je pomembna za fiziološko delovanje črevesja (3).

Včasih je veljalo, da se razvoj črevesne flore začne šele po rojstvu, saj naj bi maternica predstavljala sterilno okolje za razvoj ploda, vendar so nekatere novejši raziskave potrdile prisotnost mikroorganizmov

v maternici in v mekoniju, zato lahko domnevamo, da se proces kolonizacije črevesja z mikroorganizmi začne že pri plodu v maternici (1). Mehanizem prenosa mikroorganizmov v črevo ploda je najverjetneje aktivno »požiranje« plodovnice. V zadnjem tromesečju nosečnosti plod namreč začne »požirati« večje količine plodovnice, zato se domneva, da je kolonizirana z enakimi mikroorganizmi kot posteljica. Gre za vertikalni prenos mikroorganizmov, tj. prenos organizmov z matere na otroka pred rojstvom (prek posteljice), med rojstvom (prek stika z nožnično ali kožno floro) ali po njem (prek stika s kožno floro); zato bi bilo smiselno sklepati, da prehitra prekinitev nosečnosti lahko vpliva na spremenjen razvoj črevesne flore novorojenčka in predstavlja dejavnik tveganja za pogostejši razvoj okužb, bolezní in zapletov (1).

Kljub temu da se črevesna flora najverjetneje začne razvijati že med nosečnostjo, se bolj stabilna črevesna flora začne pojavljati med porodom in se dokončno razvije šele po porodu. Novorojenček se namreč med porodom in po rojstvu kolonizira prek matere z vertikalnim prenosom organizmov (iz nožnične in kožne flore ter materinega mleka); in prek okolja s horizontalnim prenosom organizmov (zrak, predmeti, ostali ljudje). Horizontalni prenos poteka med posamezniki iste generacije, torej med osebami (in okolico), ki niso starši in njihovi otroci. Velja omeniti, da med porodom pride do prenosa nožnične flore na (in v) otroka le, če je porod vaginalen.

Po porodu razvoj črevesne flore novorojenčkov zaznamujeta predvsem dva večja dogodka: dojenje in začetek hranjenja z gosto hrano (4). Na razvoj črevesne flore novorojenčka pomembno vpliva tudi uporaba umetnega mleka oz. t. i. »mlečne formule«. Rezultati nekaterih raziskav namreč kažejo, da je uporaba lahko vzrok za nastanek manj stabilne in bolj raznolike črevesne flore (1, 5).

Črevesna flora nedonošenih novorojenčkov v prvih tednih po rojstvu je v primerjavi s črevesno floro donošenih novorojenčkov manj raznolika in manj stabilna ter je kolonizirana z več patogenimi mikroorganizmi. Eden izmed glavnih vzrokov za tako stanje je nezrelost črevesne stene nedonošenega novorojenčka, ki otežuje naseljevanje mikroorganizmov v črevesju (tako v maternici (*in utero*) kot postnatalno). Vzrok za manjšo raznolikost in stabilnost ter pogostejšo kolonizacijo s patogenimi mikroorganizmi pri nedonošenih novorojenčkih naj bi, poleg prekratkega znotrajmaterničnega razvoja (ta namreč vodi v slabše razvito črevesno steno), predstavljali tudi (1):

- prezgodnji razpok plodovih ovojev,
- okužbe matere,
- večja pojavnost porodov s carskim rezom,
- pogostejša raba antibiotikov,

- uporaba drugih zdravil, ki vplivajo na delovanje črevesja,
- spremenjena motiliteta črevesja,
- obdobja kasnejšega začetka enteralnega hranjenja in
- kasnejši stik z materinim mlekom.

Manj raznolika in manj stabilna črevesna flora nedonošenih novorojenčkov pomembno prispeva k nezrelosti encimskega in imunskega sistema novorojenčka ter predstavlja tveganje za razvoj okužb, bolezni in zapletov nedonošenosti. Povzamemo lahko, da so nedonošeni novorojenčki skupina z večjim tveganjem za razvoj okužb, bolezni in zapletov nedonošenosti, nekatere izmed teh navajamo v nadaljevanju (1).

Normalna in patološka neonatalna flora v nazofarinksu in sluhovodu novorojenčka

Ostfeld in sodelavci so preučevali bakterijsko floro v nazofarinksu in sluhovodu, pri novorojenčkih, starih od treh do sedmih dni. Brisi izločkov, odvzetih iz nazofarinksa, so pokazali, da je bilo največ novorojenčkov (39 %) koloniziranih z bakterijami normalne flore odraslih (za to odvzemno mesto), sledila je skupina otrok s po Gramu pozitivnimi potencialno patogenimi mikroorganizmi (23 %), nato s po Gramu negativnimi bacili (16 %). Sterilno kulturo so dokazali pri 22 % otrok v preiskovanem vzorcu. Najpogostejše izolirane klice so bile *Staphylococcus epidermidis* (39 %), *Staphylococcus aureus* (11 %) in *Escherichia coli* (8 %) (6).

Pri brisih, odvzetih iz sluhovoda, je bilo prav tako največ novorojenčkov koloniziranih z bakterijami normalne flore odraslih (za to odvzemno mesto; 37 %), sledili so otroci s kolonizacijo s po Gramu negativnimi bacili (24 %), nazadnje pa tisti s potencialno patogenimi po Gramu pozitivnimi mikroorganizmi (5 %). Sterilno kulturo so dokazali pri 34 % otrok v preiskovanem vzorcu. Najpogostejše izolirane

bakterije so bile *Staphylococcus epidermidis* (37 %), *Escherichia coli* (8 %) in *Klebsiella pneumoniae* (7,5 %) (6).

Nastanek in razvoj neonatalne flore s patogenimi mikroorganizmi

Zaradi odsotnosti oz. omejenega števila stikov z okolico je glavni mehanizem kolonizacije novorojenčka s patogenimi mikroorganizmi vertikalni prenos, ki poteka bodisi prek posteljnice *in utero* bodisi prek materine nožnične in kožne flore med porodom in po njem. Vertikalni prenos je najverjetneje prevladujoč mehanizem prenosa patogenih mikroorganizmov na novorojenčka (7).

Med vaginalnim porodom pride novorojenček v stik z materino nožnično in kožno floro. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* in *Streptococcus agalactiae* so pogosto prisotne bakterije pri aerobnem bakterijskem vaginitisu. Njihova pojavnost se pri nosečnicah giblje med 4–8 % (8). Med vaginalnim porodom se te bakterije prenesejo na otroka v do polovici primerov (9). Profilaktična uporaba antibiotikov nosečnice naj bi po ugotovitvah raziskave Grischke in sodelavcev značilno znižala kolonizacijo otroka z bakterijo *Streptococcus agalactiae* (s 50 % na 20 % primerov prenosa na novorojenčka) (10).

V raziskavi Rossa in Needhama je v roku 24 ur po porodu prišlo do ujemanja nožnične flore matere in flore kužnin iz popka novorojenčka v 24 % primerov, sluhovoda novorojenčka v 33 % primerov in ust novorojenčka v 38 % primerov (11). V raziskavi Hwanga in sodelavcev so se v 26 % primerov iz nožnične flore mater na novorojenčka prenesli patogeni mikroorganizmi, najpogostejše je to bila bakterija *Escherichia coli* (9).

MacGregor in Tunnessen sta v prospektivni raziskavi prišla do zaključka, da je sluhovod novorojenčka nahajališče potencialno patogenih mikroorganizmov, ki tja najverjetneje pridejo z vertikalnim prenosom.

V raziskavi so ugotovili 60-% ujemanje med mikroorganizmi iz sluhovoda in materino nožnično floro, po drugi strani pa se je flora nazofarinksa (otrok) le redko ujemala z materino nožnično floro (prav tako so bili v nazofarinksu redko prisotni patogeni mikroorganizmi) (8).

Izboljševanje črevesne flore novorojenčkov

Na izboljševanje črevesne flore lahko vplivamo na različne načine. Najenostavnejši način je uporaba antibiotikov tako pri nosečnicah kot tudi neposredno na novorojenčkih, kjer je ključnega pomena njihova preudarna raba. Antibiotiki (pre- in postnatalno) so namreč lahko vzrok za razvoj črevesne disbioze oz. jo lahko poslabšajo (12). Po rojstvu (najpogostejše pri nedonošenčkih) uporabljamo probiotike in druge pristope za izboljševanje njihove črevesne flore.

Probiotiki so definirani kot mikroorganizmi, ki ob zadostnem vnosu povzročajo blagodejne učinke na zdravje gostitelja (osebe, ki je probiotike prejela) (9). Probiotike se uporablja za izboljševanje črevesne flore nedonošenih novorojenčkov tako pre- kot postnatalno (13). Ker imajo nedonošeni novorojenčki v primerjavi z donošenimi slabše možnosti za razvoj zdrave črevesne flore, se jim v nekaterih centrih za intenzivno nego po Evropi pogosto predpisujejo probiotiki. Velja pa omeniti, da strokovnjaki v Evropi trenutno še niso soglasni glede uporabe probiotikov v centrih za intenzivno nego nedonošenih novorojenčkov (14, 15).

Redkeje uporabljen pristop, ki se izvaja le pri novorojenčkih z operativno dokončanim porodom (carskim rezom), je naknadna kolonizacija ust novorojenčkov z nožnično floro matere. Pri porodu s carskim rezom namreč ne pride do stika novorojenčka z nožnično floro matere, zato nekateri zdravniki po carskem rezu ročno vnesejo vsebino nožničnega brisa matere

v ustno votlino otroka, da bi s tem zagotovili prenos nožnične flore matere na otroka. Med tem postopkom se sterilna gaza vstavi v materino nožnico pred carskim rezom, nato pa se z njo obrišejo novorojenčkova usta, obraz in telo, s čimer se poskuša posnemati izpostavljenost pri vaginalnem porodu. Teoretično naj bi s tem preprostim posegom »obnovili« prvotne kolonizirajoče mikrobe (iz nožnične flore matere) pri otroku, rojenim s carskim rezom, in tako zmanjšali tveganje za kronične vnetne bolezni, ki se jih povezuje s carskim rezom (16).

Zelo pomembno je tudi hranjenje z materinim mlekom, ki ima po podatkih raziskav številne prednosti pred mlečno formulo. Ameriška pediatrična akademija (American Academy of Pediatrics, AAP), Svetovna zdravstvena organizacija (World Health Organization, WHO), Mednarodni krizni sklad Združenih Narodov (United Nations International Children's Emergency Fund, UNICEF) ter Center za nadzor bolezni (Center for Disease Control, CDC) zato do šestega meseca starosti priporočajo izključno hranjenje z materinim mlekom, ki naj bi v primerjavi z mlečno formulo vsebovalo več beljakovin, ključnih za razvoj črevesja, imunskega sistema in živčevja (17).

Intestinalna disbioza in intoleranca na hranjenje

Intestinalna disbioza je definirana kot neravnovesje v črevesni flori, v povezavi z boleznijo (18). Pri novorojenčkih se disbioza lahko razvije kot posledica okolja, v katerem po porodu bivajo, materine flore, materine diete, načina poroda, vrste hranjenja (dojenje/mlečna formula/parenteralno hranjenje) in rabe antibiotikov. Prisotnost intestinalne disbioze pri novorojenčkih predstavlja dejavnik tveganja za razvoj avtoimunskih bolezni, atopije, debelosti, nekrotizirajočega enterokolitisa (angl. *necrotizing enterocolitis*, NEC), bakteriemije ter sepse (19, 20).

Pogost zaplet nedonošenih novorojenčkov je tudi intoleranca na hranjenje. Po izsledkih nekaterih raziskav naj bi na razvoj intolerance lahko vplivala patološka črevesna flora novorojenčka, natančneje povečan delež bakterij rodu *Klebsiella* (21). Pri intoleranci na hranjenje gre za to, da nerazvit prebavni sistem s težavo prebavlja dovolj hranil, potrebnih za nadaljnjo rast in razvoj. Zelo nedonošene novorojenčke se zato prehranjuje parenteralno z dodanimi hranili, elektroliti, vitamini ter oligoelementi, kasneje pa se hranjenje nadaljuje prek oro- ali nazogastrične sonde z maminim mlekom ali mlečno formulo. Pogost zaplet, še posebno ob uporabi oro- ali nazogastrične sonde, je gastroezofagealni refluks (GER) (22).

Težji zapleti oz. bolezni nedonošenosti

Nedonošeni novorojenčki, predvsem tisti, ki so zelo ali izjemno nedonošeni, so zaradi nezrelosti organskih sistemov in celotnega telesa podvrženi številnim boleznim in zapletom. Med pomembnejše zaplete (bolezni) nedonošenosti prištevamo: nekrotizirajoči enterokolitis (angl. *necrotizing enterocolitis*, NEC), sindrom sistemskega vnetnega odziva (angl. *systemic inflammatory response syndrome*, SIRS) in sepo (pri novorojenčkih jo delimo na zgodnjo, ki se razvije v prvih 72 urah po rojstvu, in kasno, ki se razvije po več kot 72 urah po rojstvu), bronhopulmunalno displazijo (BPD), retinopatijo nedonošenosti (angl. *retinopathy of prematurity*, ROP), okužbo novorojenčka s citomegalovirusom (CMV) ter pnevmotoraks (23–28).

Utemeljitev raziskave

V zadnjih 20 letih se je preživetje zelo nedonošenih novorojenčkov (< 28 tednov gestacije) močno povečalo; v nekaterih medicinskih ustanovah celo do 65 % za otroke gestacijske starosti 23 tednov. Pomemben diagnostični in terapevtski

vidik obravnave nedonošenih novorojenčkov je zagotovo mikrobiološko testiranje. Tukaj gre predvsem za mikrobiološka testiranja krvi (hemokulture), ki so osnova za diagnosticiranje sepse; pa tudi ostalih kužnin, med drugim blata (29). Mikrobiološko testiranje blata na prevladujočo črevesno floro je (bila) ustaljena praksa na Enoti za intenzivno terapijo in nego novorojencev (EINT) Kliničnega oddelka (KO) za perinatologijo (Porodnišnica Ljubljana), Ginekološka klinika, Univerzitetni klinični center (UKC) Ljubljana, kljub temu da ne obstaja veliko raziskav, ki bi potrjevale diagnostično veljavnost takega testiranja. Zato smo se raziskovalci odločili izvesti retrospektivno raziskavo, s katero smo na podlagi preteklih primerov, v katerih so se lečeči zdravniki odločili za mikrobiološko testiranje blata na prevladujočo aerobno črevesno floro, dokazali oz. ovrgli, obstoj povezave med mikrobiološkim testiranjem blata in razvojem kasnejših okužb, bolezni in zapletov nedonošenosti, pri novorojenčkih z izjemno nizko gestacijsko starostjo. Poleg tega je bil namen analizirati tudi povezavo med rezultati mikrobiološkega testiranja blata in morebitnih ostalih mikrobioloških testiranj kužnin iz ostalih odvzemnih mest (predvsem sluhovoda in nazofarinksa).

METODE

Med septembrom 2023 in julijem 2024 je bila na EINT, KO za perinatologijo, Ginekološka klinika, UKC Ljubljana, izvedena retrospektivna raziskava, ki jo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko. Zbiranje podatkov (pregled dokumentacije preiskovancev) je potekalo med marcem in majem 2024 na EINT, KO za perinatologijo, Ginekološka klinika, UKC Ljubljana.

Preiskovani vzorec

V vzorec so bili vključeni vsi novorojenčki, obravnavani na EINT, KO za perinatologijo, Ginekološka klinika, UKC Ljubljana med

letoma 2017 in 2022, ki so ustrezali vključitvenim in izključitvenim kriterijem. Med tema letoma je bilo na Ginekološki kliniki UKC Ljubljana rojenih 33.109 otrok, 334 živorojenih je bilo izjemno nedonošenih (< 28 tednov gestacije), od tega jih je 55 ustrezalo vključitvenim kriterijem raziskave.

Vključitveni in izključitveni kriteriji

Vključitveni kriteriji so bili rojstvo med letoma 2017 in 2022, obravnava na EINT, KO za perinatologijo, Ginekološka klinika, UKC Ljubljana, odvzem kužnine blata za mikrobiološko diagnostiko v prvih 30 dneh po rojstvu in gestacijska starost novorojenčka manj kot 28 tednov.

Izključitvena kriterija sta bila rojstvo izven Porodnišnice Ljubljana (zaradi nedostopnosti podatkov) in nedostopnost podatkov zaradi tehničnih napak.

Algoritem izbora preiskovanega vzorca je prikazan na sliki 1.

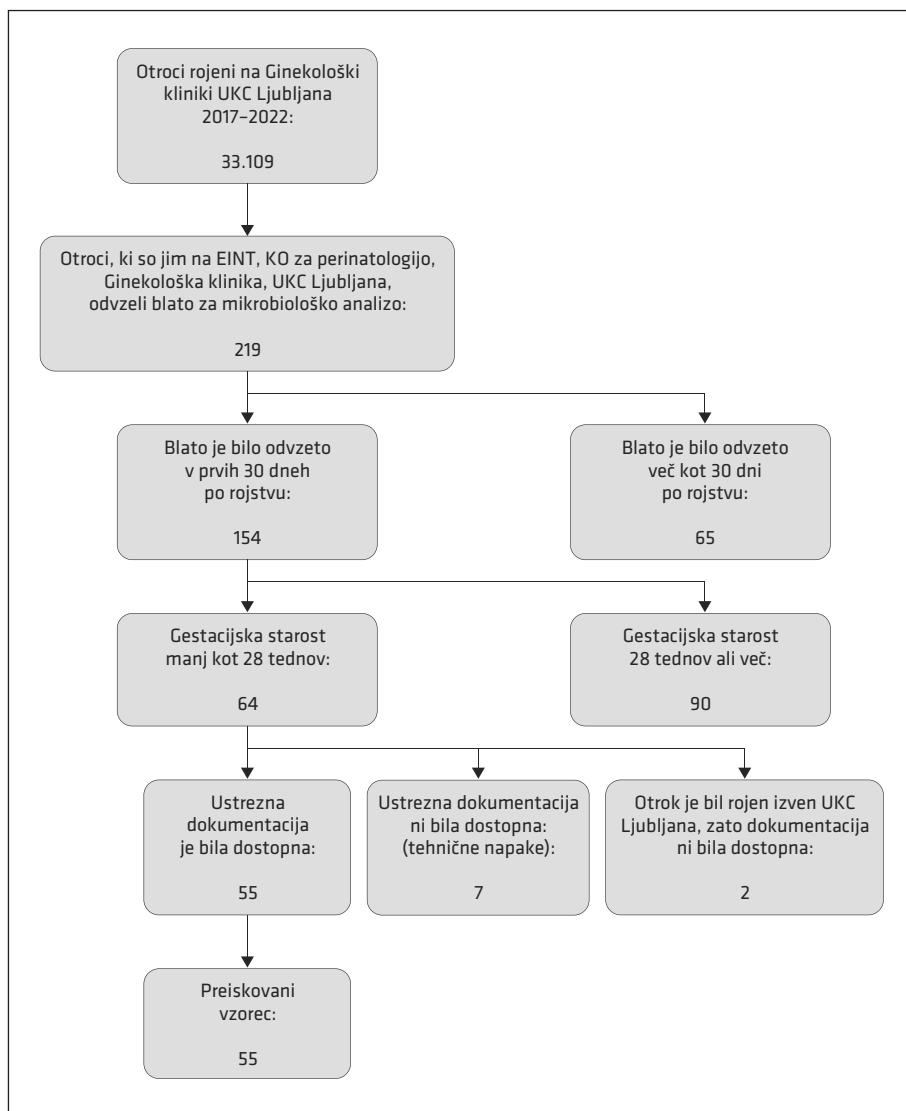
Statistična analiza podatkov

Za analizo pridobljenih opisnih spremenljivk smo uporabili test χ^2 za vse zvezne in ordinalne spremenljivke pa Mann-Whitneyjev U-test. Oba statistična testa smo izvajali pri stopnji tveganja 5 % oz. $\alpha = 0,05$.

REZULTATI

Splošni podatki

Večji del preiskovancev je bil moškega spola (65 %), preiskovank ženskega spola je bilo 35 %. Skoraj vsi novorojenčki, vključeni v raziskavo (93 %), so bili deležni neinvazivnega predihavanja, več kot polovica (62 %) pa tudi invazivnega. Povprečna gestacijska starost novorojenčkov je bila 25 tednov in štiri dni, povprečna teža je bila 763 g. Apgar 1 je v povprečju znašal 6, Apgar 5 pa 7 (Apgar je hitra ocena stanja novorojenčka takoj po porodu, ki sestoji iz ocene barve (kože), srčne frekvence, refleksov, mišičnega tonusa in dihanja, kjer posamezni parameter prispeva od 0 do 2



Slika 1. Algoritem izbora preiskovanega vzorca. Izdelano s programom Lucidchart. EINT – Enota za intenzivno nego in terapijo novorojencev, KO – klinični oodelek, UKC – Univerzitetni klinični center.

točki – torej otrok lahko dobi Apgar oceno med 0 in 10; Apgar ocena se izvede prvo minuto po porodu – Apgar 1; in peto minuto po porodu – Apgar 5) (34). Povprečna dolžina zdravljenja na EINT je bila 70 dni.

V preiskovanem vzorcu je imelo pozitivno prevladujočo aerobno črevesno floro 43 otrok (78 %), ostalih 12 (22 %) pa negativno prevladujočo aerobno črevesno floro.

Negativna (prevladujoča aerobna) črevesna flora pomeni, da iz blata novorojenčka ni bilo izoliranega nobenega patogenega aerobnega mikroorganizma; pozitivna (prevladujoča aerobna) črevesna flora pa pomeni, da je bil iz blata novorojenčka izoliran vsaj en patogen aeroben mikroorganizem. Preostali demografski podatki otrok so prikazani v tabeli 1.

Tabela 1. Demografski podatki preiskovancev (otrok). SD – standardna deviacija.

Velikost vzorca	55 ^a (100 %)
Povprečje (SD)	
Gestacijska starost (teden)	25 4/7 (1,1)
Teža ob porodu (g)	763 (172)
Apgar 1 min (0–10 točk)	6 (2,32)
Apgar 5 min (0–10 točk)	7 (1,97)
Število dni na intenzivni negi	70 (29)
Število otrok (delež)	
Moški spol (da)	36 (65 %)
Ženski spol (da)	19 (35 %)
Zahirani (da)	11 (20 %)
Predihavani z masko (da)	20 (36 %)
Intubirani (da)	11 (20 %)
Dodatek kisika takoj po rojstvu (da)	29 (53 %)
Neinvazivno predihavanje (da)	51 (93 %)
Invazivno predihavanje (da)	34 (62 %)
Ostala respiratorna podpora (da)	15 (27 %)
Raba vazopresorjev (da)	2 (4 %)

^a V vzorcu so bili s štirje pari dvojčkov (osem otrok, štiri matere), kjer sta bila oba otroka vključena v preiskovani vzorec.

Tabela 2. Demografski podatki mater. SD – standardna deviacija, IQR – interkvartilni razmik (angl. *inter-quartile range*).

Velikost vzorca:	51 ^a (100 %)	
	Povprečje (SD)	Mediana (IQR)
Starost (leta)	31 (5,99)	/
Število predhodnih porodov	/	0 (1)
	Število nosečnic (delež)	
Gestacijski diabetes (da)	4 (8 %)	
Preeklampsija (da)	7 (14 %)	
Primarna hipertenzija (da)	4 (8 %)	
Glukokortikoidi (da)	38 (75 %)	
Magnezijev sulfat (da)	42 (82 %)	
Horioamnionitis (da)	11 (22 %)	
Antibiotiki pred porodom (da)	39 (76 %)	

^a V vzorcu so bili štirje pari dvojčkov (osem otrok, štiri matere), kjer sta bila oba otroka vključena v preiskovani vzorec, torej je bilo v vzorcu le 51 mater, ne 55 (kot je preiskovancev).

Povprečna starost mater otrok iz preiskovanega vzorca je znašala v povprečju 31 let. Za večino mater je bil porod otroka, obravnavanega v raziskavi, prvi. Prenatalno je glukokortikoide prejelo 75 %, magnezijev sulfat med porodom 82 %, antibiotike med porodom pa 76 % nosečnic. Preostali demografski podatki o nosečnosti mater rojenih nedonošenčkov so prikazani v tabeli 2.

Analiza povezave med pozitivno in negativno prevladujočo aerobno črevesno floro novorojenčkov in različnimi prenatalnimi in postnatalnimi stanji, zapleti in boleznimi novorojenčkov/nosečnic

Povezava med stanji/bolezni oz. obravnavo nosečnic ter prevladujočo aerobno črevesno floro njihovih otrok

V tabeli 3 so prikazani podatki o številu primerov, kjer je mati imela gestacijski diabetes, preeklampsijo, primarno hipertenzijo, horioamnionitis (angl. *chorioamnionitis*, CHA) oz. je prejela antibiotike (pred porodom), glukokortikoide (pred porodom) in/ali magnezijev sulfat (med porodom), in o številu otrok z določeno prevladujočo aerobno črevesno floro v teh primerih.

Razvidno je, da so vse p-vrednosti testa χ^2 večje od največje dovoljene napake prve vrste 5 %. Iz tega sledi, da statistično značilno ni mogoče dokazati povezave med gestacijskim diabetesom, preeklampsijo, primarno hipertenzijo, CHA, prejemanjem glukokortikoidov, antibiotikov ali magnezijevega sulfata ter verjetnostjo, ali bo otrok te matere imel pozitivno oz. negativno prevladujočo aerobno črevesno floro.

Povezava med lastnostmi/obravnavo otrok ter njihovo prevladujočo aerobno črevesno floro

V tabeli 4 so prikazani podatki o številu novorojenčkov z določenimi lastnostmi (spol, zahiran otrok (angl. *small for gestational age*, SGA), otrok, prevelik za gesta-

cijsko starost (angl. *large for gestational age*, LGA; takih otrok v vzorcu sicer ni bilo). Prikazani so tudi podatki o številu otrok z določeno obravnavo po rojstvu (dodatek kisika takoj po rojstvu, uporaba invazivnega ter neinvazivnega predihavanja, ostala respiratorna podpora, raba vazopresorjev, prejemanje antibiotikov ob odvzemu blata, prejemanje probiotikov ob odvzemu blata) in tem, kakšna je bila njihova prevladujoča aerobna črevesna flora v teh primerih. Razvidno je, da so vse p-vrednosti testa χ^2 večje od največje dovoljene napake prve vrste 5 %.

Iz tega sledi, da statistično značilno ni mogoče dokazati povezave med spolom otroka, SGA, dodatkom kisika takoj po rojstvu, invazivnim ali neinvazivnim predihavanjem, potrebo po ostali respiratorni podpori, uporabo vazopresorjev, antibiotikov (v času odvzema blata) ali/in probiotikov (ob odvzemu blata) ter tem, ali bo otrok matere imel izolirano pozitivno oz. negativno prevladujočo aerobno črevesno floro.

Povezava med boleznimi novorojenčkov ter prevladujočo aerobno črevesno floro

V tabeli 5 so prikazani podatki o številu novorojenčkov z določeno boleznijo (postavljeno diagnozo na bolezen/okvaro/stanje: pnevmotoraks, NEC, zgodnja/kasna sepsa, SIRS, CMV, pljučnica, BPD, ROP) in tem, kakšna je bila njihova prevladujoča aerobna črevesna flora. Razvidno je, da so vse p-vrednosti testa χ^2 večje od največje dovoljene napake prve vrste 5 %.

Iz tega sledi, da statistično značilno nismo dokazali povezave med tem, da ima otrok pozitivno oz. negativno aerobno prevladujočo črevesno floro, in pojavom pnevmotoraksa, NEC, zgodnje/kasne sepe, SIRS, CMV, pljučnice, BPD ali ROP. To govori proti diagnostični uporabnosti mikrobiološkega izvida blata (izolaciji črevesne flore) za napovedovanje pojava katere koli od naštetih bolezni.

Tabela 3. Analiza deležev pozitivne in negativne prevladujoče aerobne črevesne flore novorojčkov pri različnih stanjih/boleznih nosečnic pred porodom. CHA – horioamnionitis (angl. *chorioamnionitis*).

Velikost vzorca	55 ^a						
	Gestacijski diabetes (ne)	Preeklampsija (ne)	Primarna hipertenzija (ne)	CHA (ne)	Glukokortikoidi (ne)	Antibiotiki prenatalno (ne)	Magnezijev sulfat (ne)
Število primerov	51	48	51	44	13	12	11
	Gestacijski diabetes (da)	Preeklampsija (da)	Primarna hipertenzija (da)	CHA (da)	Glukokortikoidi (da)	Antibiotiki prenatalno (da)	Magnezijev sulfat (da)
Število primerov	4 (100 %)	7 (100 %)	4 (100 %)	11 (100 %)	42 (100 %)	43 (100 %)	44 (100 %)
Število nosečnic z otroki s pozitivno prevladujočo črevesno floro (delež)	4 (100 %)	5 (71 %)	2 (50 %)	10 (91 %)	33 (79 %)	33 (77 %)	36 (82 %)
Število nosečnic z otroki z negativno prevladujočo črevesno floro (delež)	0 (0 %)	2 (29 %)	2 (50 %)	1 (9 %)	9 (21 %)	10 (23 %)	8 (18 %)
p-vrednost testa χ^2 ($\alpha = 0,05$)	0,27	0,64	0,16	0,25	0,90	0,63	0,07

^a Ker ni nujno, da imata oba dvojčka določene nosečnice enako prevladujočo aerobno črevesno floro, se je smatralo, da je nosečnic 55 (ne 51).

Tabela 4. Analiza deležev pozitivne in negativne prevladujoče aerobne črevesne flore pri različnih postnatalnih stanjih nedonošenih otrok, z rezultati testa χ^2 -kvadrat. SGA – zahiran otrok (angl. *small for gestational age*), LGA – otrok prevelik za gestacijsko starost (angl. *large for gestational age*).

Velikost vzorca	55										
	Moški spol (ne)	Ženski spol (ne)	SGA (ne)	LGA (ne)	Dodatek kisika takoj po rojstvu (ne)	Neinvazivno predihavanje (ne)	Invazivno predihavanje (ne)	Ostala respiratorna podpora (ne)	Raba vazopresorjev (ne)	Antibiotiki ob odvzemu blata (ne)	Probiotiki ob odvzemu blata (ne)
Število primerov	19	36	11	0	26	4	21	40	53	20	9
	Moški spol (da)	Ženski spol (da)	SGA (da)	LGA (da)	Dodatek kisika takoj po rojstvu (da)	Neinvazivno predihavanje (da)	Invazivno predihavanje (da)	Ostala respiratorna podpora (da)	Raba vazopresorjev (da)	Antibiotiki ob odvzemu blata (da)	Probiotiki ob odvzemu blata (da)
Število primerov	36 (100 %)	19 (100 %)	11 (100 %)	0 (100 %)	29 (100 %)	51 (100 %)	34 (100 %)	15 (100 %)	2 (100 %)	35 (100 %)	46 (100 %)
Število otrok s pozitivno prevladujočo aerobno črevesno floro (delež)	30 (83 %)	13 (68 %)	8 (73 %)	0 (0 %)	20 (69 %)	39 (76,5 %)	24 (71 %)	13 (87 %)	1 (50 %)	25 (71 %)	36 (78 %)
Število otrok z negativno prevladujočo aerobno črevesno floro (delež)	6 (17 %)	6 (32 %)	3 (27 %)	0 (0 %)	9 (31 %)	12 (23,5 %)	10 (29 %)	2 (13 %)	1 (50 %)	10 (29 %)	10 (22 %)
p-vrednost testa χ^2 ($\alpha = 0,05$)	0,20	0,20	0,62	/	0,08	0,27	0,08	0,35	0,33	0,11	0,97

Tabela 5. Analiza deležev pozitivne in negativne črevesne flore pri različnih boleznih nedonošenih novorojenčkov z rezultati testa χ^2 -kvadrat. NEC – nekrotizirajoči enterokolitis (angl. *nerotising enterocolitis*), zgodnja sepsa – pojavila se je v roku 72 ur po porodu, kasna sepsa – pojavila se je kasneje kot 72 ur po porodu, SIRS – sindrom sistemskega vnetnega odziva (angl. *severe systemic inflammatory syndrome*), CMV – citomegalovirus, BPD – bronhopulmonalna displazija, ROP – retinopatija nedonošenosti (angl. *retinopathy of prematurity*).

Velikost vzorca		55									
	Pnevmotoraks (ne)	NEC (ne)	Zgodnja sepsa (ne)	Kasna sepsa (ne)	SIRS (ne)	CMV (ne)	Pljučnica (ne)	BPD (ne)	ROP (ne)		
Število primerov	53	48	53	36	29	49	48	25	25		
	Pnevmotoraks (da)	NEC (da)	Zgodnja sepsa (da)	Kasna sepsa (da)	SIRS (da)	CMV (da)	Pljučnica (da)	BPD (da)	ROP (da)		
Število primerov	2 (100 %)	7 (100 %)	2 (100 %)	19 (100 %)	26 (100 %)	6 (100 %)	7 (100 %)	30 (100 %)	30 (100 %)		
Število otrok s pozitivno prevladujočo aerobno črevesno floro (delež)	1 (50 %)	5 (71 %)	2 (100 %)	14 (74 %)	18 (69 %)	6 (100 %)	4 (57 %)	26 (87 %)	25 (83 %)		
Število otrok z negativno prevladujočo aerobno črevesno floro (delež)	1 (50 %)	2 (29 %)	0 (0 %)	5 (26 %)	8 (31 %)	0 (0 %)	3 (43 %)	4 (13 %)	5 (17 %)		
p-vrednost testa χ^2 ($\alpha = 0,05$)	0.33	0.64	0.45	0.56	0.56	0.17	0.15	0.10	0.31		

Vpliv prevladujoče aerobne črevesne flore na izbrane spremenljivke

V tabeli 6 so prikazani podatki o povprečnih vrednostih in medianah (kjer je varianca visoka) v skupinah otrok s pozitivno in z negativno prevladujočo aerobno črevesno floro: števila dni po rojstvu, ko je bilo odvzeto blato; števila dni na intenzivni negi, gestacijski starosti otrok, telesni masi otrok, vrednosti C-reaktivne beljakovine (angl. *C-reactive protein*, CRP) otrok (tri dni pred/po odvzemu blata), vrednosti levkocitov otrok (tri dni pred/po odvzemu blata), Apgar 1 in Apgar 5. Razvidno je, da je pri vseh izbranih parametrih p-vrednost Mann-Whitneyjevega U-testa večja od največje dovoljene napake prve vrste 5 %. Iz tega sledi, da:

- V preiskovanem vzorcu ni statistično značilnih razlik v času odvzema kužnine (blata) med skupinama otrok s pozitivno in negativno prevladujočo aerobno črevesno floro.
- Rezultat mikrobiološke analize (pozitivna/negativna prevladujoča aerobna črevesna flora) statistično značilno ne napoveduje krajše oz. daljše oskrbe na intenzivni negi.
- V gestacijski starosti otrok med skupinama otrok s pozitivno in negativno prevladujočo aerobno črevesno floro ni statistično značilnih razlik.
- Telesna masa ob rojstvu in prevladujoča aerobna črevesna flora statistično značilno nista povezani (tj. večja masa ne napoveduje določene prevladujoče aerobne črevesne flore in obratno).

Presenetljivo je dejstvo, da v preiskovanem vzorcu med skupinama s pozitivno oz. negativno prevladujočo aerobno črevesno floro ni bilo statistično značilnih razlik pri obravnavanih kazalcih prisotnosti vnetja (CRP in levkociti). Ob prisotnosti okužbe bi namreč vedno pričakovali povišane kazalce vnetja.

Med skupinama z izolirano pozitivno oz. negativno prevladujočo aerobno črevesno

floro prav tako ni bilo statistično značilnih razlik v Apgar ocenah (Apgar 1 in Apgar 5).

Analiza med rezultati mikrobiološke analize blata novorojenčkov in mikrobiološke analize kužnin drugih odvzemnih mest novorojenčka

Odvzem kužnin iz drugega odvzemnega mesta do vključno sedmega dne po porodu

V skupno 9 primerih se je izolirana klica ujemala bodisi v blatu, ki je bilo odvzeto ob sumu na kasno okužbo (kar pomeni obdobje 8.–30. dne po porodu – v nadaljevanju se »sum na kasno okužbo« vedno navezuje na to obdobje), in nazofarinksu takoj po porodu (kar pomeni obdobje 0.–7. dne po porodu – v nadaljevanju se »takoj po porodu« vedno navezuje na to obdobje) bodisi v blatu ob sumu na kasno okužbo in sluhovodu takoj po porodu. Enake klice so bile izolirane iz vseh treh odvzemnih mest (blato ob sumu na kasno okužbo, sluhovod in nazofarinks takoj po porodu) le v 3 primerih (oz. v 6 % primerov izmed vseh, ki so jim odvzeli tako bris sluhovoda kot bris nazofarinksa takoj po porodu – 49 novorojenčkov). Iz tega sledi, da je bilo v vzorcu 6 otrok (oz. 12 % primerov izmed vseh, ki so jim odvzeli tako bris sluhovoda kot bris nazofarinksa takoj po porodu – 49 otrok), pri katerih se je izolirana klica ujemala bodisi v blatu ob sumu na kasno okužbo in nazofarinksu takoj po porodu, bodisi v blatu ob sumu na kasno okužbo in sluhovodu takoj po porodu. V vzorcu teh šestih otrok se je v 3 primerih ujemala klica v vseh 3 kužninah, v dveh primerih samo v blatu in nazofarinksu ter v 1 primeru samo v blatu in sluhovodu. Te otroke obravnavamo v nadaljevanju (naslednje poglavje, tabela 8).

Rezultati mikrobiološke analize blata ob sumu na kasno okužbo ter kužnine iz nazofarinksa takoj po porodu se v 70 % niso ujemali, rezultati mikrobiološke analize blata ob sumu na kasno okužbo ter kužnine iz sluhovoda takoj po porodu pa v 73 %. To je prikazano v tabeli 7.

Tabela 6. Analiza podatkov med skupinama otrok s pozitivno in z negativno prevladujočo aerobno črevesno floro, z rezultati Mann-Whitneyjevega U-testa. SD – standardna deviacija, CRP – C-reaktivna beljakovina (angl. *C-reactive protein*), Apgar – ocena otrokovega stanja po petih kriterijih (Apgar1 – ocena prvo minuto po rojstvu, Apgar 5 – ocena peto minuto po rojstvu), IQR – interkvartilni razmik (angl. *interquartile range*).

Velikost vzorca	55							
	Odvzem blata (zaporedni dan po rojstvu)	Čas v intenzivni negi (število dni)	Gestacijska starost (tedni)	Telesna masa ob rojstvu (g)	CRP na dan odvzema blata +/- 3 dni (mg/L)	Levkociti na dan odvzema blata +/- 3 dni ($\times 10^9$ celic/L)	Apgar 1 (0-10 točk)	Apgar 5 (0-10 točk)
Povprečna vrednost skupine otrok s pozitivno prevladujočo aerobno črevesno floro (SD)	15. (6)	72 (31)	25 4/7 (1,0)	767 (176)	22,3 (30,7)	22,6 (11,1)	6,0 (2,3)	6,7 (2,0)
Povprečna vrednost skupine otrok z negativno prevladujočo aerobno črevesno floro (SD)	15. (8)	69 (22)	25 4/7 (0,9)	746 (161)	26,7 (28,3)	23,8 (14,3)	5,3 (2,5)	6,3 (2,1)
Mediana skupine otrok s pozitivno prevladujočo aerobno črevesno floro (IQR)	15. (7)	/	/	/	8,0 (12,5)	20,5 (16,3)	/	/
Mediana skupine otrok z negativno prevladujočo aerobno črevesno floro (IQR)	16. (10)	/	/	/	16,5 (21,8)	20,4 (10,7)	/	/
p-vrednost Mann-Whitneyjevega U-testa ($\alpha = 0,05$)	/	0,37	0,75	0,87	0,46	0,48	0,43	0,69

Tabela 7. Povezava med mikrobiološko analizo blata (prevladujočo aerobno črevesno floro) ob sumu na kasno okužbo (8.–30. dan po porodu) ter izolati iz kužnin nazofarinksa ter sluhovoda takoj po porodu (0.–7. dan po porodu).

Velikost vzorca	55	Drugo odvzemno mesto (0.–7. dan po porodu)	
		Nazofarinks	Sluhovod
Število odvzetih kužnin		51 (100 %)	52 (100 %)
Število primerov, kjer sta bili otroku odvzeti kužnini iz obeh odvzemnih mest		49 (100 %)	
Število otrok z enako izolirano klico v blatu in na drugem odvzemnem mestu (delež)		5 (10 %)	4 (8 %)
Število otrok z enako izolirano klico v blatu in obeh preostalih odvzemnih mestih (delež)			3 (6 %)
Število otrok z negativno prevladujočo aerobno črevesno floro in negativnim mikrobiološkim rezultatom iz drugega odvzemnega mesta (delež)		10 (20 %)	10 (19 %)
Število otrok z negativno prevladujočo aerobno črevesno floro in negativnim mikrobiološkim rezultatom iz obeh preostalih odvzemnih mest (delež)			6 (12 %)
Rezultata mikrobioloških testiranj iz odvzemnega mesta in blata se ne ujemata (delež)		36 (70 %)	38 (73 %)
Rezultati mikrobioloških testiranj iz vseh treh odvzemnih mest (blato, nazofarinks, sluhovod) se ne ujemajo (delež)			42 (82 %)
Klice, ki so bile izolirane iz blata in še iz drugega odvzemnega mesta, takoj po porodu – pred odvzemom blata (0.–7. dan po porodu)			
		2x <i>Escherichia coli</i> 1x <i>Streptococcus agalactiae</i> 2x <i>Enterococcus faecalis</i>	1x <i>Escherichia coli</i> 1x <i>Streptococcus agalactiae</i> 1x <i>Enterococcus faecalis</i> 1x <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Klice, ki so bile izolirane iz blata in hkrati iz obeh preostalih odvzemnih mest, takoj po porodu – pred odvzemom blata (0.–7. dan po porodu)			
		1x <i>Escherichia coli</i> 1x <i>Streptococcus agalactiae</i> 1x <i>Enterococcus faecalis</i>	

Odvzem kužnine iz drugega odvzemnega mesta istočasno kot blato ob sumu na kasno okužbo

V tabeli 8 obravnavamo skupino šestih otrok, opredeljenih pod prejšnjim poglavjem. Prikazani so podatki o ujemanju klic, izoliranih iz blata ob sumu na kasno okužbo, ter klicami iz kužnin nazofarinksa oz. sluhovoda, odvzetih takoj po porodu, z odvzetimi kužninami iz različnih odvzemnih mest ob sumu na kasno okužbo.

Samo pri dveh od 49 otrok (v 4 %; prvi dve vrstici tabele 8) je obstajala povezava med črevesno floro, odvzeto ob sumu na kasno okužbo, klicami iz kužnin nazofarinksa oz. sluhovoda, odvzetimi takoj po porodu, in kužninami, odvzetimi iz različnih odvzemnih mest ob sumu na kasno okužbo. Natančneje, v kužnini iz aspirata sapnika je bila prisotna bakterija *Streptococcus agalactiae*, v drugem primeru pa sta bili izolirani *Klebsiella pneumoniae* in *Enterococcus faecalis*. V preostalih 96 % primerov (torej v večini – 47 novorojenčkov od 49) take povezave nismo zaznali.

RAZPRAVA

V raziskavi smo se osredotočili na tri vprašanja, in sicer:

- Ali obstajajo povezave med prevladujočo aerobno črevesno floro odvzeto med zdravljenjem (ob sumu na kasno okužbo) in težjimi zapleti in boleznimi nedonošenosti?
- Ali obstajajo povezave med floro v sluhovodu ali nazofarinksu odvzeto takoj po porodu in prevladujočo aerobno črevesno floro odvzeto med zdravljenjem (ob sumu na kasno okužbo)?
- Ali obstajajo povezave med floro v sluhovodu ali nazofarinksu takoj po porodu, prevladujočo aerobno črevesno floro odvzeto med zdravljenjem (ob sumu na kasno okužbo), ter kužninami, odvzetimi med zdravljenjem (ob sumu na kasno okužbo)?

Glede na tri vprašanja smo postavili tri hipoteze; odgovore nanje navajamo v nadaljevanju.

Povezava med prevladujočo aerobno črevesno floro, odvzeto med zdravljenjem, in težjimi zapleti in boleznimi nedonošenosti

Rezultati, prikazani v tabeli 5, ne potrjujejo naše prve hipoteze o tem, da obstaja povezava med prevladujočo aerobno črevesno floro in težjimi zapleti in boleznimi nedonošenosti izjemno nedonošenih novorojenčkov (< 28 tednov gestacije).

Raziskovalci so v raziskavah, na področju prevladujoče aerobne črevesne flore v povezavi z boleznimi in težjimi zapleti nedonošenosti, v primerjavi z našimi rezultati našli različne, včasih tudi nasprotujoče si ugotovitve.

Pammi in sodelavci so v sistematičnem pregledu in metaanalizi 14 raziskav preučevali prisotnost intestinalne disbioze v skupini novorojenčkov, pri katerih se je kasneje razvil NEC (30). Izsledki njihove metaanalize nakazujejo, da bi spreminjanje črevesne flore lahko pripomoglo k preprečevanju NEC. Duan in sodelavci so prav tako ugotovili, da je delež kužnin, pozitivnih na bakterije rodov *Bacteroides* in *Klebsiella*, višji v skupini novorojenčkov z NEC kot v kontrolni skupini, medtem ko so bili deleži pozitivnih na *Escherichia coli* in bakterije rodov *Bifidobacterium* in *Lactobacillus* nižji (31). Ta rezultat je pokazal, da se je število črevesnih probiotičnih bakterij (rodova *Bifidobacterium* in *Lactobacillus*) po pojavu NEC zmanjšalo, medtem ko se je število patogenov (rod *Klebsiella*) povečalo. Po njihovih navedbah bi bil to lahko pomemben patološki dejavnik v patogenezi NEC.

Ma in sodelavci so v raziskavi dokazali statistično značilno večjo raznolikost prevladujoče aerobne črevesne flore v kontrolni skupini kot pa v skupini novorojenčkov s kasno sepsa in pljučnico. Med skupinama otrok s kasno sepsa in pljučnico niso zaznali

Tabela 8. Povezava med izolati kužnin šestih otrok z enakimi klicami v črevesni flori (ob sumu na kasno okužbo, 8.–30. dan po porodu) in nazofarinksu ali slušnovodu (takoj po porodu, 0.–7. dan po porodu) ter odvzetimi kužninami iz različnih odvzemnih mest ob sumu na kasno okužbo (8.–30. dan po porodu) / – kužnina za mikrobiološko analizo ni bila odvzeta.

Velikost vzorca		Odvzem kužnine ob sumu na kasno okužbo (8.–30. dan po porodu)							Antibiotiki (8.–30. dan po porodu)	
6		Hemokultura	Likvor	Nazofarinks	Aspirat sapnika	Venski/arterijski kateter	Popek	Prejemal antibiotike	Če da, katere	
Enaka izolirana bakterija v nazofarinksu oz. slušnovodu ob rojstvu in v prevladujoči aerobni črevesni flori ob sumu na kasno okužbo										
<i>Streptococcus agalactiae</i>		/	/	/	<i>Streptococcus agalactiae</i>	/	/	da	gentamicin, penicilin	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>		/	/	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	/	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	/	da	gentamicin, ampicilin	
<i>Enterococcus faecalis</i>		/	/	/	/	negativno	<i>Serratia marcescens</i>	da	vankomicin, gentamicin	
<i>Escherichia coli</i>		/	/	/	/	/	/	ne		
<i>Escherichia coli</i>		/	/	/	/	/	/	da	metronidazol, cefotaksim, vankomicin	
<i>Enterococcus faecalis</i>		/	/	/	/	/	/	ne		

pomembnih razlik v prevladujoči aerobni črevesni flori (32).

V nasprotju z omenjenimi tremi raziskavami so Wandro in sodelavci ugotovili, da sta mikrobiom (črevesna flora) in metabolom blata pri nedonošenih otrocih drugačna pri vsakem posamezniku in nista pogojena z zdravstvenimi izidi (boleznimi), vključno z NEC in kasno sepso (33). To se sklada z ugotovitvami naše raziskave.

Povezava med prevladujočo aerobno črevesno floro, odvzeto med zdravljenjem, in med aerobno floro v sluhovodu in nazofarinksu, odvzeto takoj po porodu

Rezultati (tabela 7) ne potrjujejo hipoteze, da obstaja povezava med prevladujočo aerobno črevesno floro, odvzeto ob sumu na kasno okužbo, in med aerobno floro v sluhovodu in nazofarinksu, odvzeto takoj po porodu.

Pri tem raziskovalnem vprašanju nas je zanimalo, ali so bakterije, ki so bile izolirane iz blata ob sumu na kasno okužbo, enake tistim v sluhovodu in nazofarinksu v prvih sedmih dneh po porodu. Bakterije iz sluhovoda in nazofarinksa so tiste klice, ki so na otroka najverjetneje prišle iz nožnične flore med nosečnostjo in porodom – z vertikalnim prenosom. Z drugimi besedami, zanimalo nas je, ali (prevladujoča aerobna) črevesna flora nakazuje na vertikalni prenos mikroorganizmov. Pričakovali smo, da bodo enake klice kot v sluhovodu in nazofarinksu otroka prisotne tudi v (aerobni) črevesni flori (blatu), vendar te povezave nismo zaznali. Iz tega sledi, da nismo uspeli dokazati, da (prevladujoča aerobna) črevesna flora nakazuje na vertikalni prenos telesne flore z mame na otroka.

Grischke in sodelavci ugotavljajo, da pride do prenosa klic z matere na otroka v do 50 % primerov. V raziskavi MacGregorja in Tunnessena pa se je večji del flore sluhovoda ujemal z nožnično floro. Z obzirom na

rezultate raziskave MacGregorja in Tunnessena, smo v primeru, da bi se enake klice nahajale tako v sluhovodu kot tudi v nazofarinksu, pričakovali, da bodo enake bakterije prisotne tudi v črevesju (črevesni flori). Te povezave nismo zaznali (8).

Preiskovancem so iz blata in kužnin iz vseh ostalih odvzemnih mest izolirali po Gramu pozitivne in negativne aerobne klice, ki se pojavljajo kot del normalne flore, prenesene bodisi z vertikalnim prenosom bodisi s horizontalnim. Klice so bile normalno občutljive na testirane antibiotike. V nobenem od primerov nismo izolirali po Gramu pozitivne ali negativne klice, ki bi bila odporna na razširjen spekter β -laktamskih antibiotikov (angl. *extended-spectrum beta-lactamases*, ESBL); na vankomicin odpor- nih enterokokov (angl. *vancomycin resistant enterococci*, VRE) ali na meticilin odpornih stafilokokov (angl. *meticilin resistant Staphylococcus aureus*, MRSA). To govori v prid temu, da se v enoti, ki skrbi za najmanjše nedonošene novorojenčke (EINT), držijo načela preudarne rabe antibiotikov, ko je to potrebno, in toliko časa, kot je to potrebno (angl. »*antibiotic stewardship*«).

Povezava med prevladujočo aerobno rastočo črevesno floro, aerobno rastočo floro v sluhovodu in nazofarinksu ter izolati iz kužnin, odvzetih ob sumu na kasno okužbo

Rezultati (tabela 8) ne potrjujejo hipoteze, da obstaja povezava med prevladujočo aerobno rastočo črevesno floro, aerobno rastočo floro v sluhovodu in nazofarinksu (tako po porodu) ter izolati iz kužnin, odvzetih ob sumu na kasno okužbo, saj v večini (96 %) primerov nismo zaznali povezave, ki jo predvideva hipoteza.

Vrednotenje raziskave

Prednost raziskave je velik nabor podatkov, ki smo jih zbrali za posameznega novorojenčka. To nam je omogočalo celosten pre-

gled novorojenčkovega mikrobiološkega in zdravstvenega stanja.

Slabost raziskave je majhen vzorec preiskovancev (le 55 preiskovancev, zajetih v 7-letnem obdobju od 2017 do 2022), ki otežuje posploševanje ugotovitev na populacijo ter zmanjšuje moč raziskave. Omeniti velja tudi dejstvo, da v določenih primerih pri vseh otrocih nismo imeli vseh podatkov, saj določen mikrobiološki test pri otroku ni bil izveden. To je še dodatno zmanjšalo vzorec na določenih preiskovanih področjih (npr. vsem otrokom ni bil odvzet aspirat sapnika). Poleg tega sta bili skupini v preiskovanem vzorcu neenakomerno veliki (prevladujoča aerobna pozitivna in negativna črevesna flora), kar je zmanjšalo možnost za doseganje statistično značilnega rezultata.

Zaradi majhnega vzorca sta posploševanje in sklepanje o trdnih zaključkih težja. Kljub temu naša raziskava vsekakor služi kot dobro izhodišče za nadaljnje raziskovanje na tem področju. Če se v nadaljnjih raziskavah izkaže, da odvzem blata ni smiselno, se to lahko uvede v klinični praksi (prenehanje jemanja blata) ter zdravstveni sistem razbremeni nepotrebnih diagnostičnih testiranj.

Zaključki

To je prva raziskava v slovenskem prostoru, ki se osredotoča na analizo prevladujo-

če črevesne flore (blata) zelo nedonošenih otrok (< 28 tednov gestacije).

Naše glavno zanimanje pred začetkom raziskave je bilo, ali je nedonošenim otrokom sploh smiselno jemati blato za mikrobiološko diagnostiko. V raziskavi se je izkazalo, da jemanje blata ni smiselno, saj nikjer nismo zaznali značilnih razlik med skupinama otrok s pozitivno in negativno prevladujočo aerobno črevesno floro. Prav tako so rezultati pokazali, da razen s floro nazofarinksa ne obstaja povezava z nobeno izmed flor na najpogostejših odvzemnih mestih (kri, sluhovod, aspirat sapnika), kar nakazuje, da (prevladujoča aerobna) črevesna flora ni dober pokazatelj vertikalnega prenosa klic.

Iz tega lahko zaključimo, da glede na rezultate te raziskave odvzem blata za mikrobiološko diagnostiko ni smislen, saj ni diagnostično poveden (za napovedovanje bolezni in obolevnosti) in zanesljiv za potrjevanje okužbe.

ZAHVALA

Raziskovalci se iskreno zahvaljujemo doc. dr. Mateji Pirš za dostopnost do mikrobioloških izvidov, njeno pomoč in svetovanje ob izvedbi raziskave. Prav tako se študenta raziskovalca iskreno zahvaljujeta mentorjema za njuno pomoč in neprecenljive nasvete ob izvedbi te raziskave.

LITERATURA

1. Gritz EC, Bhandari V. The human neonatal gut microbiome: A brief review. *Front Pediatr.* 2015; 3: 60. doi: 10.3389/fped.2015.00060
2. Fricke WF. The more the merrier? Reduced fecal microbiota diversity in preterm infants treated with antibiotics. *J Pediatr.* 2014; 165 (1): 8–10. doi: 10.1016/j.jpeds.2014.03.022
3. Reynoso-García J, Miranda-Santiago AE, Meléndez-Vázquez NM, et al. A complete guide to human microbiomes: Body niches, transmission, development, dysbiosis, and restoration. *Front Syst Biol.* 2022; 2: 951403. doi: 10.3389/fsysb.2022.951403
4. Tanaka M, Nakayama J. Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life. *Allergol Int.* 2017; 66 (4): 515–22. doi: 10.1016/j.alit.2017.07.010
5. Guaraldi F, Salvatori G. Effect of breast and formula feeding on gut microbiota shaping in newborns. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012; 2: 94. doi: 10.3389/fcimb.2012.00094
6. Ostfeld E, Segal J, Segal A, et al. Bacterial colonization of the nose and external ear canal in newborn infants. *Isr J Med Sci.* 1983; 19 (12): 1046–9.
7. Ferretti P, Pasolli E, Tett A, et al. Mother-to-infant microbial transmission from different body sites shapes the developing infant gut microbiome. *Cell Host Microbe.* 2018; 24 (1): 133–45.e5. doi: 10.1016/j.chom.2018.06.005
8. MacGregor RR, Tunnessen WW. The incidence of pathogenic organisms in the normal flora of the neonate's external ear and nasopharynx. *Clin Pediatr (Phila).* 1973; 12 (12): 697–700. doi: 10.1177/000992287301201214
9. Hwang J, Kim S, Kim H, et al. Predictive factors for perinatal bacterial transmission from colonized mothers to delivered very-low-birth-weight infants: A retrospective cohort study. *Sci Rep.* 2024; 14 (1): 16835. doi: 10.1038/s41598-024-67674-7
10. Grischke EM, Kaufmann M, Rabe T, et al. B-streptococci in obstetrics—risks and consequences of maternal colonization and neonatal contamination. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 1992; 52 (6): 335–9. doi: 10.1055/s-2007-1023762
11. Ross JM, Needham JR. Genital flora during pregnancy and colonization of the newborn. *J R Soc Med.* 1980; 73 (2): 105–10.
12. Morreale C, Giaroni C, Baj A, et al. Effects of perinatal antibiotic exposure and neonatal gut microbiota. *Antibiotics (Basel).* 2023; 12 (2): 258. doi: 10.3390/antibiotics12020258
13. Butel MJ, Suau A, Campeotto F, et al. Conditions of bifidobacterial colonization in preterm infants: A prospective analysis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007; 44 (5): 577–82. doi: 10.1097/MPG.0b013e3180406b20
14. Blanchetière A, Dolladille C, Goyer I, et al. State of the art of probiotic use in neonatal intensive care units in french-speaking European countries. *Children.* 2023; 10 (12): 1889. doi: 10.3390/children10121889
15. Chang CM, Tsai MH, Liao WC, et al. Effects of probiotics on gut microbiomes of extremely preterm infants in the neonatal intensive care unit: A prospective cohort study. *Nutrients.* 2022; 14 (15): 3239. doi: 10.3390/nu14153239
16. Hourigan SK, Dominguez-Bello MG, Mueller NT. Can maternal-child microbial seeding interventions improve the health of infants delivered by Cesarean section? *Cell Host Microbe.* 2022; 30 (5): 607–11. doi: 10.1016/j.chom.2022.02.014
17. O'Sullivan A, Farver M, Smilowitz JT. The influence of early infant-feeding practices on the intestinal microbiome and body composition in infants. *Nutr Metab Insights.* 2015; 8 (Suppl 1): 1–9. doi: 10.4137/NMI.S29530
18. Singh VP, Proctor SD, Willing BP. Koch's postulates, microbial dysbiosis and inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol Infect.* 2016; 22 (7): 594–9. doi: 10.1016/j.cmi.2016.04.018
19. Underwood MA, Mukhopadhyay S, Lakshminrusimha S, et al. Neonatal intestinal dysbiosis. *J Perinatol.* 2020; 40 (11): 1597–608. doi: 10.1038/s41372-020-00829-2
20. Pierra A, van Saene HK, Jones MD, et al. Clinical impact of abnormal gut flora in infants receiving parenteral nutrition. *Ann Surg.* 1998; 227 (4): 547–52. doi: 10.1097/00000658-199804000-00016
21. Yuan Z, Yan J, Wen H, et al. Feeding intolerance alters the gut microbiota of preterm infants. *PLoS One.* 2019; 14 (1): e0210609. doi: 10.1371/journal.pone.0210609
22. Behrman RE, Butler AS, Institute of Medicine (US) Committee on Understanding Premature Birth and Assuring Healthy Outcomes. *Preterm birth: Causes, consequences, and prevention: Mortality and acute complications in preterm infants.* Washington (DC): National Academies Press (US); 2007. doi: 10.17226/11622
23. Lopes RB, Moreira MEL, Hermeto F. Necrotizing enterocolitis. *Perinatology: evidence-based best practices in perinatal medicine. StatPearls [internet].* 2023 [citirano 2025 Jan 7]; 1215–28. Dosegljivo na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513357/>

24. Velkavrh M, Paro Panjan D. Neonatalna sepsa. Med Razgl. 2013; 52 (1): 71–7.
25. J Pomerantz W, L Weiss S. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and sepsis in children: definitions, epidemiology, clinical manifestations, and diagnosis. UpToDate [internet]. 2024 [citirano 2025 Jan 7]. Dosegljivo na: <https://www.uptodate.com/contents/systemic-inflammatory-response-syndrome-sirs-and-sepsis-in-children-definitions-epidemiology-clinical-manifestations-and-diagnosis>
26. NHLBI: Newborn breathing conditions – bronchopulmonary dysplasia (BPD) [internet]. Bethesda: National Heart, Lung, and Blood Institute; c2022 [citirano 2025 Jan 7]. Dosegljivo na: <https://www.nhlbi.nih.gov/health/bronchopulmonary-dysplasia>
27. Kadambari S, Whittaker E, Lyall H. Postnatally acquired cytomegalovirus infection in extremely premature infants: How best to manage? Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2020; 105 (3): 334–9. doi: 10.1136/archdis-child-2019-317650
28. Jovandarić MZ, Milenković SJ, Dotlić J, et al. Neonatal pneumothorax outcome in preterm and term newborns. Medicina (Kaunas). 2022; 58 (7): 965. doi: 10.3390/medicina58070965
29. Ward RM, Beachy JC. Neonatal complications following preterm birth. BJOG. 2003; 110 Suppl 20: 8–16. doi: 10.1016/s1470-0328(03)00012-0
30. Pammi M, Cope J, Tarr PI, et al. Intestinal dysbiosis in preterm infants preceding necrotizing enterocolitis: A systematic review and meta-analysis. Microbiome. 2017; 5 (1): 31. doi: 10.1186/s40168-017-0248-8
31. Duan M, Han Z, Huang N. Changes of intestinal microflora in neonatal necrotizing enterocolitis: A single-center study. J Int Med Res. 2020; 48 (9): 300060520957804. doi: 10.1177/0300060520957804
32. Ma Y, Peng X, Zhang J, et al. Gut microbiota in preterm infants with late-onset sepsis and pneumonia: A pilot case-control study. BMC Microbiol. 2024; 24 (1): 272. doi: 10.1186/s12866-024-03419-w
33. Wandro S, Osborne S, Enriquez C, et al. The microbiome and metabolome of preterm infant stool are personalized and not driven by health outcomes, including necrotizing enterocolitis and late-onset sepsis. mSphere. 2018; 3 (3): e00104-18. doi: 10.1128/mSphere.00104-18
34. Watterberg KL, Benitz WE, Cummings JJ, et al. The Apgar score. Pediatrics. 2015; 136 (4): 819–22. doi: 10.1542/peds.2015-2651

Prispelo 8. 1. 2025