

АНОТАЦІЯ

Ищенко О. В. Стан респіраторного мікробіоценозу при муковісцидозі у дітей та експериментальне обґрунтування його корекції. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії, галузь знань – 22 «Охорона здоров'я», спеціальність – 222 «Медицина». – Міністерство охорони здоров'я України, Дніпровський державний медичний університет, Дніпро, 2022 р.

Дисертаційна робота виконана на кафедрі мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології Дніпровського державного медичного університету. Дисертація є фрагментом науково-дослідної роботи кафедри мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології та кафедри пропедевтики дитячих хвороб Дніпровського державного медичного університету «Бронхіти у дітей з коморбідними станами: клінічний перебіг та їх сучасна етіологія» (№ державної реєстрації 0116U004962), термін виконання 01.2017 – 11.2021 р. р.

Мета дослідження – підвищення ефективності кліренсу патобіотів в респіраторному тракті дітей з МВ на основі вивчення спектру колонізаторів, їх чутливості до антибактеріальних засобів, пробіотичних мікроорганізмів та умов середовища.

Новизна дослідження та одержаних результатів. В дисертаційному дослідженні з використанням розширеного культурального методу вперше описано стан респіраторного мікробіоценозу при МВ у дітей Дніпровського регіону та вперше встановлено локальний профіль хіміотерапевтичної чутливості патобіонтів, асоційованих з захворюванням. Мікробіом дихальних шляхів дітей хворих на МВ відрізнявся пригніченням нормальної мікробіоти та надмірним різноманіттям патогенів, які, зазвичай, не є характерними для загальної популяції. Різноманіття коменсалів дихальних шляхів дітей з МВ було бідним, видовий склад включав представників родів *Corynebacterium*, *Streptococcus* та *Aerococcus*. Якісна та кількісна характеристика коменсальної

мікробіоти змінювалася з віком негативно – сумарно частка коагулаза-негативних *Staphylococcus spp.*, а також *Streptococcus*, *Aerococcus spp.*, *Corynebacterium spp.* *Lactobacillus spp.* та *Neisseria spp.* становила 61,1% ізолятів у віці до 2 років, 48,0% – від 6 до 12 років і 35,3% – старше 15 років ($p < 0,05$). Поширеність коменсалів також негативно корелювала з віком. Тож, у віці до 2 років поширеність коменсалів становила 111,1%, від 2 до 6 років – 64,2%, від 6 до 12 років – 51,4%, а у віці старше 15 років – 43,8% ($p < 0,001$). Основними патогенами в дитячому віці були *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Aspergillus fumigatus*.

В науково-дослідній роботі доповнено знання про можливості міжмікробної взаємодії в дихальних шляхах при МВ та показано, що присутність неферментуючих грам-негативних мікроорганізмів (НФГНМО) негативно впливає на колонізацію коагулаза-негативними представниками роду *Staphylococcus* ($p < 0,001$), а також *Streptococcus spp.* ($p < 0,001$), *Haemophilus spp.* ($p < 0,05$), порядку *Enterobacterales* ($p < 0,05$). І навпаки, поява НФГНМО пов'язана з набуттям плісневих грибів ($p < 0,001$).

В нашому дослідженні описано патогномонічні властивості основних патобіонтів, асоційованих з МВ. Для *S. aureus* було характерно утворення малих колоніальних форм (МКФ) – 11,1% після лікування аміноглікозидами та/або сульфаніламидами, а також при ко-інфекції з *P. aeruginosa* ($p < 0,001$). Чутливими до усіх β -лактамів були лише 20,4% (95%ДІ 53,7-79,6) ізолятів *S. aureus*, частка метицилін-резистентних (*MRSA*) складала 5,3%. *S. aureus* з ауксотрофною модифікацією були більш стійкими до β -лактамів та гентаміцину ($p < 0,05$). Профіль хіміотерапевтичної чутливості *P. aeruginosa* був варіабельним: сприйнятливими до усіх пеніцилінів були 62,1% (95%ДІ 52,1-71,5) ізолятів, в той час, як чутливість при збільшеній експозиції до цефтазідиму і цефепіму становила 82,5% і 72,8% відповідно. Мукоїдні ізоляти були більш стійкі, ніж немуюїдні до пеніцилінів ($p < 0,001$) та цефалоспоринів ($p < 0,05$).

В нашому дослідженні доповнено знання про адгезивний та біоплівкоутворюючий потенціал основний патобіонтів асоційованих з МВ. *S. aureus* та *P. aeruginosa*, мали значний адгезивний потенціал та біоплівкоутворюючу здатність. Між адгезивним потенціалом *S. aureus* і *P. aeruginosa* та їх біоплівко-утворюючою активністю виявлено пряму кореляційну залежність, $r_s = 0,84$ ($p < 0,001$) і $r_s = 0,95$ ($p < 0,001$) відповідно.

В нашому дослідженні вперше визначено антагоністичні властивості аутопробіотиків та несимбіонтних мікроорганізмів проти патобіонтів, асоційованих з МВ, що наділені високими вірулентним властивостями. Симбіонти *Aerococcus viridans*, музейний штам *A. viridans* 167 та *Bacillus clausii* мали виражений антагоністичний потенціал проти опортуністів та патогенів, виділених з дихальних шляхів дітей з МВ, проте ендогенна мікробіота була більш активною проти *S. aureus* та *E. coli*.

В науково-дослідній роботі вперше показано, що визначено концентрацію антимікробних пептидів (АМП) hBD-2 та hCAP-18/LL-37 в мокротинні дітей, хворих на МВ та показано залежність рівня кателіцидину hCAP-18/LL-37 в дихальних шляхах при МВ від колонізації *P. aeruginosa* ($r_s = 0,63$; $p < 0,01$).

Практичне значення отриманих результатів. Нами підтверджено важливість мікробіологічного моніторингу при МВ, як одного з ключових аспектів медичного супроводу. Результати, отримані в роботі, висвітлюють основні мікробіологічні особливості патобіонтів зазвичай асоційованих з МВ. За результатами роботи та на основі світового досвіду та найкращих практик вперше в Україні розроблено методичні рекомендації для роботи з біологічним матеріалом від хворих на МВ на всіх етапах мікробіологічного дослідження з метою покращення ефективності нагляду та якості надання медичної допомоги. Нами також отримано дані про локальний профіль чутливості до протимікробних засобів, що враховується при призначенні протимікробної терапії лікарями клініцистами. Динаміка показників неспецифічного імунітету в залежності від мікробного профілю дихальних

шляхів та щільності і типу клітинної інфільтрації може бути використана лікарями-клініцистами при плануванні протизапальної терапії при МВ у дітей.

За результатами дисертації опубліковано 17 наукових праць, серед яких 7 статей, з них 1 стаття – у виданні, що індексується у системі Web of Science, 1 стаття у закордонному виданні, що індексується у системі Scopus, 3 статті у фахових виданнях на території України, 2 статті у закордонних фахових журналах, 9 тез доповідей у матеріалах конгресів та науково-практичних конференцій, 1 методичні рекомендації.

Ключові слова: муковісцидоз, мікробіоценоз, мікробіота, мікробна флора, дисбіоз, мікробіологічний профіль, мікробіологічний моніторинг, мікроорганізми, патогени, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Aerococcus viridans*, MRSA, фенотип, малі колоніальні форми, мукоїдний фенотип, біоплівки, резистентність, цитокіни, антимікробні пептиди, кателіцидин, hCAP-18/LL-37, β -дефензини, людський β -дефензин-2, неспецифічний імунітет, клітинний імунітет, мокротиння, запалення, бронхоальвеолярний секрет, діти, легені, аутопробіотики, антибактеріальна та антимікотична дія, аутосимбіонти, культивування аерококів.

ANNOTATION

Ishchenko O. V. Respiratory microbiome in children with cystic fibrosis and experimental grounding of its correction. – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

The thesis for a Doctor of Philosophy degree in the specialty 222 «Medicine» – Dnipro State Medical University, Dnipro, 2022.

The dissertation was performed in the department of microbiology, virology, immunology and epidemiology, Dnipro State Medical University. The dissertation is a fragment of research works of the department of microbiology, virology, immunology and epidemiology and department of propaedeutics of children's

diseases, Dnipro State Medical University «Bronchitis in children with comorbid conditions: clinical course and their modern etiology» (state registration № 0116U004962), terms of performing 01.2018–11.2021.

The study aimed to boost the efficiency of clearance of the respiratory pathobionts in children with CF based on the study of the spectrum of colonizers, their sensitivity to antimicrobial agents, probiotic microorganisms, and environmental conditions.

The novelty of the study and the results obtained. For the first time using the expanded cultural method the respiratory microbiome of children with CF living in Dnipro region and the local chemotherapeutic susceptibility of pathobionts was described in the study. The respiratory microbiome in children with CF was characterized by a suppression of normal microbiota and an excessive diversity of pathogens that are usually not characteristic of the general population. The diversity of respiratory tract commensals was poor in children with CF, the species composition included representatives of the genera *Corynebacterium*, *Streptococcus*, and *Aerococcus*. The qualitative and quantitative characteristics of commensal microbiota changed negatively with age, the aggregated proportion of coagulase-negative *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus*, *Aerococcus spp.*, *Corynebacterium spp.* *Lactobacillus spp.* and *Neisseria spp.* occupied 61.1% of isolates in children under 2 years of age, 48.0% - from 6 to 12 years, and 35.3% - over 15 years ($p < 0.05$). The prevalence of the mentioned commensals also negatively correlated with age. So, under 2 years old, the prevalence of commensals was 111.1%, 2 to 6 years – 64.2%, 6 to 12 years – 51.4%, above 15 years – 43.8% ($p < 0.001$). The main pathogens in childhood included *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Aspergillus fumigatus*.

In the study we completed the knowledge about microbial interactions in the CF- respiratory tract in children and shown that the presence of non-fermenting gram-negative microorganisms (NFGNMO) has a negative impact on the colonization by coagulase-negative *Staphylococcus* ($p < 0.001$), as well as

Streptococcus spp. ($p < 0.001$), *Haemophilus spp.* ($p < 0.05$), order *Enterobacterales* ($p < 0.05$). In contrast, the appearance of *P. aeruginosa* was associated with the selection of *Aspergillus* molds ($p < 0.001$). Coagulase-negative *Staphylococcus* had a significant negative effect on the colonization by *S. aureus* ($p < 0.001$).

The pathognomic changes of the main pathobionts associated with CF were described in the study. The share of small colony variants (SCVs) was 11.1%. Auxotrophic cultures were isolated after treatment with aminoglycosides and/or sulfonamides and in case of *P. aeruginosa* infection ($p < 0.001$). Only 20.4% (95% CI 53.7-79.6) of *S. aureus* isolates were sensitive to all β -lactams. The share of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) was 5.3%. Auxotrophic *S. aureus* were more resistant to β -lactams and gentamicin ($p < 0.05$).

The share of *P. aeruginosa* mucoids was 27.2% ($n = 26$), SCVs – 5.83% ($n = 6$).

The chemotherapeutic sensitivity profile of the pathogen was variable: only 62.1% (95% CI 52.1-71.5) of the isolates were susceptible to all penicillins, while the sensitivity with increased exposure to ceftazidime and cefepime was 82.5% and 72.8%, respectively. Mucoid isolates were more resistant than non-mucoid to penicillins ($p < 0.001$) and cephalosporins ($p < 0.05$).

In our study we described adhesive and biofilm-forming potential of the main pathobionts associated with CF. *S. aureus* *P. aeruginosa* had significant adhesive potential and biofilm-forming ability. There was a direct correlation between the adhesive potential of *S. aureus* and *P. aeruginosa* and their biofilm-forming activity, $r_s = 0.84$ ($p < 0.001$) and $r_s = 0.95$ ($p < 0.001$), respectively.

In our study, the activity of autoprobiotics and nonsymbiotic bacteria against pathobionts associated with CF was described for the first time. The symbionts *Aerococcus viridans*, the museum strain *A. viridans 167* and *Bacillus clausii* had a pronounced antagonistic potential against opportunists and pathogens isolated from the respiratory tract of children with CF. When comparing the antagonistic potential of the symbionts of *A. viridans* and the museum strain *A. viridans 167*, it was

established that the endogenous microbiota is more active against *S. aureus* and *E. coli*.

At the next stage of our work, for the first time we evaluated the levels of antimicrobial peptides (AMPs) hBD-2 and hCAP-18/LL-37 in the sputum of children with CF and their correlations with microbial profile of lungs. The concentration of cathelicidin hCAP-18/LL-37 in the CF-sputum correlated with the colonization of *P. aeruginosa* between the levels of determined AMPs weren't found ($r_s = 0.63$; $p < 0.001$).

The practical significance of the results. We have confirmed the importance of microbiological monitoring in cystic fibrosis as one of the key aspects of medical follow up. The results obtained in this work highlight the main microbiological features of pathobionts commonly associated with cystic fibrosis. Considering the results of the study and basing on the world best practices, for the first time a guideline for working with biological material from patients with cystic fibrosis at all stages of microbiological research were developed in Ukraine to improve the effectiveness of surveillance and quality of care. In addition, data on the local profile of antimicrobial susceptibility was obtained and is constantly considered by clinicians when prescribing antimicrobial therapy. The dynamics of non-specific immunity depending on the microbial profile of the respiratory tract and the density and type of cellular infiltration can be used by clinicians in planning anti-inflammatory therapy for children with cystic fibrosis.

Publications. According to the results of the dissertation 17 scientific works were published, including 7 articles, among which 1 article is in Ukrainian journal indexed in the Scopus, 1 article is in international journal indexed in Scopus, 3 articles in Ukrainian professional publications, 2 articles in international professional journals, 9 abstracts in the materials of congresses and scientific conferences, 1 methodological guideline.

Key words: cystic fibrosis, microbiocenosis, microbial flora, microbiological profile, dysbiosis, microbiota, microbiological monitoring, microorganisms,

Pseudomonas aeruginosa, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Aerococcus viridans*, *MRSA*, *Aerococcus*, phenotype, small colony variants, mucoid phenotype, *MRSA*, pathogens, biofilms, resistance, cytokines, cathelicidin, hCAP-18/LL-37, β -defensins, human- β -defensin-2, antimicrobial peptides, nonspecific immunity, cellular immunity, sputum, inflammation, bronchoalveolar secretions, children, lungs, autoprobiotics, antibacterial and antimycotic action, autosymbionts, cultivation of aerococci.

